



# Interaction du peptide $A\beta$ 1-42 et mutants avec des membranes modèles : de l'échelle micrométrique à l'échelle nanométrique

Sarah Henry

## ► To cite this version:

Sarah Henry. Interaction du peptide  $A\beta$ 1-42 et mutants avec des membranes modèles : de l'échelle micrométrique à l'échelle nanométrique. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université de Bordeaux, 2015. Français. <NNT : 2015BORD0159>. <tel-01269842>

**HAL Id: tel-01269842**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01269842>**

Submitted on 5 Feb 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE  
**DOCTEUR DE**  
**L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES  
SPÉCIALITÉ CHIMIE PHYSIQUE

Par Sarah HENRY

**Interaction du peptide  $A\beta_{1-42}$  et mutants avec des  
membranes modèles: de l'échelle micrométrique à l'échelle  
nanométrique**

Sous la direction de : Sophie Lecomte  
co-directeur : Christophe Cullin

Soutenue le 19 novembre 2015

Membres du jury :

Pr. SERVANT Laurent  
Dr. RAUSSENS Vincent  
Dr. REZAEI Human  
Pr. ANGELOVA Miglena  
Pr. MOLINARI Michael  
Dr. LECOMTE Sophie  
Pr. CULLIN Christophe

Professeur, Université de Bordeaux  
Directeur de recherche, Université Libre de Bruxelles  
Directeur de recherche, INRA, Université Paris Saclay  
Professeur, Université Pierre et Marie Curie  
Professeur, Université de Reims  
Directeur de recherche, CNRS, Université de Bordeaux  
Professeur, Université de Bordeaux

Président du jury  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examinatrice  
Examineur  
Directrice de thèse  
Co- Directeur de thèse



# Titre : Interaction du peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub> et mutants avec des membranes modèles: de l'échelle micrométrique à l'échelle nanométrique

## Résumé :

La maladie d'Alzheimer, maladie neurodégénérative la plus courante, est la cause de 50% des cas de démence. La maladie d'Alzheimer est provoquée par l'agrégation d'un amyloïde, le peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub>, dans le cerveau des patients.

De nombreuses études relient la toxicité des amyloïdes à l'existence de diverses structures intermédiaires survenant avant la formation des fibres et / ou leur interaction spécifique avec les membranes.

Dans cette étude, nous nous sommes centrés sur l'interaction entre des modèles membranaires et le peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub> (WT et des mutants plus ou moins toxiques) évaluée par plusieurs techniques biophysiques (ellipsométrie, PM-IRRAS, fluorescence de la ThT, fuite de calcéïne, PWR, cryo-MET). Nous avons tout d'abord étudié l'interaction avec des modèles de membrane simples (100% DOPG ou 100% DOPC). Nous avons établi que la force motrice de l'interaction entre tous les peptides et la membrane n'est pas régie par des interactions électrostatiques, mais est favorisée en présence des têtes polaires PG qui peuvent interagir avec le peptide par l'intermédiaire de liaisons hydrogènes. Nous avons démontré que l'oligomère le plus toxique induit des dommages sur les membranes de PG, ce qui diminue la formation de fibres.

Une nouvelle composition lipidique constituée de GM1, cholestérol, sphingomyéline et POPC a été choisie pour mimer les membranes neuronales. Des techniques innovantes : la spectroscopie infrarouge à l'échelle nanométrique et l'AFM haute-vitesse ont été utilisées, respectivement, pour accéder à la morphologie et la structure secondaire des peptides en présence de membranes et observer la dynamique de cette interaction. Les résultats obtenus montrent que les gangliosides GM1 et le cholestérol jouent un rôle central dans l'interaction d'A $\beta$  avec les membranes. Nous avons été en mesure de proposer un modèle du mécanisme d'interaction : A $\beta$ <sub>1-42</sub> s'accumule sur les domaines de GM1 présents dans la membrane *via* des liaisons hydrogène, puis s'insère dans la membrane par les domaines enrichis en cholestérol. Le cholestérol et les gangliosides sont nécessaires pour l'interaction d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> avec la membrane.

Afin de suivre la cinétique d'agrégation d'A $\beta$  et de comprendre ses différents états d'agrégation par spectroscopie infrarouge, l'élaboration d'une cellule microfluidique adaptée a été entreprise.

**Mots clés :** Amyloïde, peptide A $\beta$ (1-42), oligomères toxiques, interaction, modèles membranaires, gangliosides



**Institut de Chimie et de Biologie des  
Membranes et des Nano-objets**

Allée Geoffroy St Hilaire

33600 Pessac





# **Title : A $\beta$ <sub>1-42</sub> and variants interaction with membrane models : from micrometer scale to nanometer scale**

## **Abstract :**

Alzheimer's disease is the most common neurodegenerative disease, leading to 50% of dementia cases, caused by the aggregation of an amyloid, the A $\beta$ <sub>1-42</sub> peptide in patients brain.

Many studies link the toxicity of amyloids, as A $\beta$ <sub>1-42</sub> involved in Alzheimer disease, to the existence of various intermediate structures prior to fiber formation and /or their specific interaction with membranes.

In this study we focused on the interaction between membrane models and A $\beta$ <sub>1-42</sub> peptides and variants more or less toxic with several biophysical techniques (ellipsometry, PM-IRRAS, ThT fluorescence, calceine leakage, PWR, cryo-TEM). First, with simple membrane models (pure DOPG or pure DOPC), we established that the driving force for the interaction between all the peptides and membrane is not governed by electrostatic interaction but is favored in presence of PG headgroups that may interact with peptide via hydrogen bonding. We demonstrated that the most toxic oligomer induces PG membrane damage, decreasing the formation of fibers.

New lipid composition GM1, cholesterol, sphingomyelin and POPC has been chosen to mimic neuronal membranes. Innovative techniques: as nanoscale infrared spectroscopy and high-speed AFM were used to assess to the morphology and the secondary structure of the peptides in presence of membrane and to observe the dynamic of this interaction, respectively. The results obtained show that the gangliosides GM1 and the cholesterol play a central role in the interaction of A $\beta$  with membranes. We were able to propose a model of the interaction mechanism: A $\beta$ <sub>1-42</sub> firstly accumulates on the GM1 domains present in the membrane *via* hydrogen bonding and then inserts the membrane in the cholesterol enriched domains. Cholesterol and gangliosides are required for the interaction of A $\beta$ <sub>1-42</sub> with membrane.

In order to follow the kinetic of A $\beta$  aggregation and understand its different aggregation states with infrared spectroscopy, a microfluidic cell fabrication has been investigated.

**Keywords :** Amyloids, A $\beta$ (1-42) peptide, toxic oligomers, interaction, membrane models, gangliosides



**Institut de Chimie et de Biologie des  
Membranes et des Nano-objets**

Allée Geoffroy St Hilaire  
33600 Pessac



---

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté d'évaluer le travail de mes trois années de thèse. Dr. Vincent Raussens et Dr. Human Rezaei qui m'ont fait l'honneur de rapporter ce travail. Prof. Miglena Angelova et Prof. Michael Molinari pour leur participation au jury en tant qu'examineurs. Merci pour le temps que vous avez consacré à mon manuscrit et pour la discussion que nous avons pu avoir le jour de ma soutenance.

Je voudrais particulièrement remercier Prof. Laurent Servant qui, en plus de bien avoir voulu présider mon jury de thèse, a joué le rôle de mentor ces huit dernières années (et oui!) : merci pour toute ton aide, les "rattrapages" de dernière minute et d'avoir cru en moi.

Bien sur je remercie mes deux directeurs de thèse, le Dr. Sophie Lecomte et le Prof. Christophe Cullin pour m'avoir initié au monde des amyloïdes et pour la confiance que vous m'avez accordé durant ces trois années. Sophie, tu as vraiment été une chef au top : toujours disponible et à l'écoute pour le travail, toujours partante pour faire la fête (et même pour assortir ton vernis à ton poster ! Et ça, tous les directeurs de thèse ne le feraient pas !) et surtout d'un soutien indéfectible, en particulier dans les moments difficiles, merci d'avoir été là.

Je remercie également le Prof. Erick J. Dufourc, directeur du CBMN, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Merci aussi à tous les membres des deux équipes, mes collègues, qui m'ont acceptée à leurs côtés. L'équipe SPIMPAM au CBMN : Isabel, forcément, pour m'avoir patiemment initié à la PWR mais aussi pour nos conversations qui m'ont ramené au Portugal, Sabine pour tous les manip (infructueuses !) en PMIRRAS et en ATR et Etienne (si, si !) pour tes blagues (mais seulement les, quelques, drôles !). Je n'oublie pas les anciens : Audrey, Vincent et Seydou et les nouveaux Pierre et Mehdi ça a été un plaisir de vous rencontrer (même si ça a été très bref

---

pour certains). Merci aussi aux petites mains, les "bébés" stagiaires : Naoual et Willy et bon courage pour la suite!

Et l'équipe AFA à l'IBGC : Hélène, tu es la reine de la vulgarisation (scientifique), j'ai (presque) tout compris à la génétique grâce à toi et surtout merci pour avoir bien fait travailler mes zygomatiques pendant la longue attente des manips. Claude, la magicienne des peptides, toujours prête à remplir mes stocks et à filer un coup de main, dans le labo bien sur mais là où tu es une wonderwoman c'est en cuisine : merci pour les miracles que tu as fait à mon pot de soutenance! Marion, tu as su prendre la relève d'Hélène avec brio : merci on s'est bien marré et promis on va se le boire ce verre à la parcelle, et un jours peut être au Hellfest! Merci aussi à Christelle et Ioan.

Je tiens à remercier toutes les personnes avec lesquelles j'ai eu la chance de collaborer. Le Dr. Marion Decossas pour les images en cryo-microscopie électronique, Dr. Samuel Marre de l'ICMCB pour m'avoir laissé utiliser la sableuse de son laboratoire et pour toutes les discussions autour de la fabrication microfluidique, Gérald Clisson au LoF pour ton aide en salle blanche et ta disponibilité.

Je voudrais remercier le Dr. Adeline Perro-Marre de l'ISM pour m'avoir accompagné dans les méandres de la fabrication microfluidique et pour avoir partagé toutes les astuces qu tu connaissais et essayé d'en trouver d'autres quand rien ne marchait!

Enfin merci au Prof. Michael Molinari et à toute l'équipe du LRN à Reims pour m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire à trois reprises. Merci à Bogdan pour ta patience et ta disponibilité pour toute les manips en nano-IR et à Maxime pour ton expertise en AFM-haute vitesse et pour les super vidéos!

Merci également à toute l'équipe de la gestion pour leur disponibilité et leur efficacité même quand j'apportais les documents à la dernière minute.

---

MERCI! A mes deux compères ML-Jojo et Jadou. Vous êtes géniales alors merci pour tout, votre aide, votre soutien et tout ce qu'on a partagé pendant ces trois années : le home-made, les brioches, le no-poo, les carrot-cakes, le vernis et surtout les mojitos. Bon courage à toutes les deux mes poulettes! Et je peux le dire maintenant, vous avez été les rayons de soleil de mes journées!

Merci aussi à tous ceux avec lesquels je n'ai pas travaillé mais qui ont accompagnés ces trois années : Alexis, Denis, Grégoire, Laurence, Emilie, Clémence, Rémi, Marion, Natalia, Paul (dit "Schtroumpf joyeux"), Antoine et tous les Aquidociens. Hail Romain L. et Romain G., amusez-vous bien cette année!

Merci à tous les potos : Hugozinho et Lucie, Tom, Warriorounette, Julia, Djiin et Alice, Mailys et Héctor, mes vieilles copines Hannah et Léa, mon voisin de toujours Max, Loriiiiiie, Olivia, Barbarus, Juju et aussi tous ceux que j'ai oublié bien sur! Merci de m'avoir supportée et de me supporter.

Last but not least, merci à toute ma grande famille : Edith, Patrick, Priscillia, Loïc, Mamie, Tonton, Cousinette, ma belle belle-soeur Iris et les petits gars les plus adorables de la terre Ihsahn et Ivar. Bien sur, merci à mon troupeau de frangins Raphaël, Théo et Gaspard vous avez la preuve maintenant, ce n'était pas une onglerie et j'ai même un peu travaillé entre deux parties de Candy Crush. Merci pour vos encouragements et votre soutien, vous êtes au top, je veux dire VRAIMENT au top!

Adrien, juste, merci d'être là. Merci pour tous les allés-retours pendant ces trois ans, merci pour les sms blagounette qui me faisaient rire toute seule devant mon ordi et pour les autres aussi. Merci pour ton soutien sans faille et pour les (petits) coups de pied aux fesses quand il y en avait besoin. Merci d'être fier. Avec toi je me sens bien. Ah, j'allais oublier, et encore merci pour le poisson!

Enfin, chose promise, chose due, merci à ma mère sans qui je ne serais rien.

---

---

"Hell Zheimer...  
Lost my mind...

A progressive amnesia,  
Eternal hangover.  
A total dementia,  
I'll never recover.

Hell Zheimer...  
Lost my mind..."

[...]

"Hell Zheimer", *Pictavian Bastard*, Manzer, 2010



---

---

*A ma mère,*



# Table des matières

<b>Liste des abréviations</b>	<b>16</b>
.....	16
<b>Introduction</b>	<b>21</b>
.....	21
<b>Chapitre 1 État de l’art</b>	<b>25</b>
1.1 Maladies amyloïdoses .....	27
1.2 La maladie d’Alzheimer .....	28
1.2.1 Impacts sociaux économiques .....	28
1.2.2 Historique .....	29
1.2.3 Critères cliniques .....	29
1.2.4 Histopathologie .....	30
1.2.4.1 Les Dégénérescences NeuroFibrillaires (DNF)	31
1.2.4.2 Les plaques amyloïdes .....	32
1.2.5 La cascade amyloïde .....	32
1.2.6 Le peptide $A\beta$ .....	34
1.2.6.1 La protéine <i>APP</i> ( <i>Amyloid Precursor Protein</i> ) : précurseur de l’amyloïde .....	35
1.2.6.2 $A\beta_{1-40}$ versus $A\beta_{1-42}$ .....	36
1.3 Les amyloïdes .....	36
1.3.1 Des peptides qui s’auto-assemblent spontanément .....	36
1.3.2 Cinétique de formation des fibres .....	38
1.3.3 Caractérisation des fibres par leur propriété tinctoriale	39
1.3.4 Structure secondaire en feuillets- $\beta$ .....	40

1.3.5	Morphologie fibrillaire . . . . .	41
1.4	Formes toxiques d'A $\beta$ . . . . .	42
1.4.1	Caractérisation de la structure secondaire d'A $\beta$ : feuillets- $\beta$ parallèles versus anti-parallèles . . . . .	43
1.4.2	Formation des oligomères toxiques : " <i>on-pathway ver-</i> <i>sus off-pathway</i> " . . . . .	44
1.4.3	Un modèle de toxicité d'A $\beta$ . . . . .	46
1.4.3.1	A $\beta$ et ses mutants . . . . .	46
1.4.3.2	Mutants d'A $\beta_{1-42}$ de toxicités variables . . .	46
1.5	Cible des amyloïdes : la membrane . . . . .	48
1.5.1	Des membranes biologiques aux membranes artificielles	48
1.5.1.1	Composition chimique des membranes biolo- giques . . . . .	49
1.5.2	Modèle d'interaction protéine amyloïde-membrane . .	53
1.5.3	Membranes modèles . . . . .	56
1.5.3.1	Monocouches de Langmuir . . . . .	56
1.5.3.2	Les liposomes . . . . .	57
1.5.3.3	Bicouches supportées . . . . .	58
1.5.4	Interaction d'A $\beta_{1-40}$ et A $\beta_{1-42}$ avec des modèles mem- branaires . . . . .	58
1.6	Conclusions et objectifs de la thèse . . . . .	62

## **Chapitre 2 Étude de l'interaction des amyloïdes A $\beta_{1-42}$ avec des modèles membranaires simples : zwitterioniques *versus* anioniques**

**63**

2.1	Introduction . . . . .	65
2.2	Interaction du peptide A $\beta_{1-42}$ avec des monocouches lipidiques à l'interface air-eau . . . . .	66
2.2.1	Principe de l'ellipsométrie et de la Spectroscopie In- fraRouge de Réflexion Absorption par Modulation de Polarisation (PM-IRRAS) . . . . .	66
2.2.1.1	L'ellipsométrie . . . . .	66

2.2.1.2	Le PM-IRRAS . . . . .	66
2.2.2	Résultats . . . . .	66
2.2.3	Discussion . . . . .	71
2.3	Interaction des amyloïdes A $\beta_{1-42}$ avec des bicouches lipidiques	72
2.3.1	Mise en évidence de l'effet d'A $\beta_{1-42}$ sur l'intégrité mem- branaire . . . . .	72
2.3.1.1	Fluorescence de la calcéïne . . . . .	72
2.3.1.2	Résultats . . . . .	73
2.3.1.3	Discussion . . . . .	75
2.3.2	La résonance de plasmons pour l'étude de l'accumula- tion d'A $\beta_{1-42}$ sur des bicouches supportées . . . . .	76
2.3.2.1	Principe de la résonance de plasmons aux ondes guidées (PWR) . . . . .	76
2.3.2.1.1	La spectroscopie PWR . . . . .	76
2.3.2.2	Résultats . . . . .	76
2.3.2.3	Discussion . . . . .	83
2.3.3	Influence des lipides sur l'auto-assemblage d'A $\beta_{1-42}$ . .	83
2.3.3.1	Fluorescence de la Thioflavine T . . . . .	83
2.3.3.1.1	La Thioflavine . . . . .	83
2.3.3.2	Résultats . . . . .	84
2.3.3.3	Discussion . . . . .	86
2.3.4	Impact d'A $\beta_{1-42}$ sur la morphologie de liposomes anio- niques . . . . .	87
2.3.4.1	Principe de la cryo-microscopie électronique à transmission . . . . .	87
2.3.4.1.1	La cryo-TEM . . . . .	87
2.3.4.2	Résultats . . . . .	87
2.3.4.3	Discussion . . . . .	90

2.3.5	Conclusions . . . . .	91
<b>Chapitre 3 Structure et morphologie d'A<math>\beta</math> en interaction avec des membranes</b>		<b>93</b>
3.1	Introduction . . . . .	95
3.2	Structure d'A $\beta$ en interaction avec des modèles membranaires constitués de GM1, Chol, SM et POPC . . . . .	95
3.2.1	Principe du nano-Infra Rouge . . . . .	95
3.2.2	Résultats et discussion . . . . .	96
3.2.2.1	Morphologies et structures des fibres d'A $\beta_{1-42}$	96
3.2.2.2	Interaction d'A $\beta_{1-42}$ -WT et du mutant G37C avec des membranes modèles . . . . .	98
3.2.2.2.1	Formation et observation des dépôts lipidiques . . . . .	98
3.2.2.2.2	Interaction des peptides d'A $\beta$ avec le modèle GM1/ Chol/ SM/ PC . . . . .	100
3.2.2.2.3	Importance du cholestérol dans l'interaction d'A $\beta$ avec des modèles membranaires . . . . .	102
3.2.3	Discussion et conclusions . . . . .	107
<b>Chapitre 4 Conception d'une cellule microfluidique : pour étudier l'auto-assemblage des fibres amyloïdes</b>		<b>109</b>
4.1	Introduction . . . . .	111
4.2	Hydrodynamique des fluides dans les systèmes microfluidiques	112
4.3	Cahier des charges . . . . .	112
4.3.1	Échantillonnage . . . . .	112
4.3.1.1	Détermination du matériau . . . . .	112
4.3.1.2	Géométrie du système . . . . .	113

4.3.1.3	Dimensions du canal . . . . .	114
4.3.2	Méthodes de fabrication . . . . .	116
4.3.2.1	La photolithographie . . . . .	116
4.3.2.2	La gravure . . . . .	117
4.3.2.3	Le moulage . . . . .	117
4.4	Résultats . . . . .	119
4.4.1	Résine SU-8 . . . . .	120
4.4.1.1	Défauts du masque . . . . .	120
4.4.1.2	Optimisation du protocole de microfabrication	120
4.4.1.3	Etape de collage . . . . .	125
4.4.2	Colle photosensible . . . . .	127
4.4.3	Micro moulage . . . . .	128
4.5	Discussion . . . . .	129
4.6	Conclusions . . . . .	130
<b>Chapitre 5 Dynamique d'A<math>\beta_{1-42}</math> à la résolution nanométrique</b>		<b>131</b>
5.1	Introduction . . . . .	133
5.2	Dynamique de l'interaction A $\beta$ -bicouche lipidique . . . . .	133
5.2.1	Principe de l'AFM haute vitesse, <i>High-speed AFM</i> (HS-AFM) . . . . .	133
5.2.2	Morphologie et dynamique des peptides d'A $\beta_{1-42}$ . . .	134
5.2.3	Protocole de formation des bicouches lipidiques . . . .	137
5.2.4	Résultats . . . . .	140
5.2.4.1	Effet d'A $\beta_{1-42}$ et de oG37C sur des dépôts lipidiques contenant GM1 et Cholestérol . . .	140
5.2.4.2	Rôle des gangliosides et du Cholestérol dans le mécanisme d'interaction . . . . .	143
5.2.5	Discussion . . . . .	145
5.3	Conclusions . . . . .	147
<b>Conclusions et perspectives</b>		<b>151</b>
. . . . .		151



<b>Annexes</b>	<b>153</b>
6.4 Expression et purification des peptide $A\beta_{1-42}$ . . . . .	155
6.5 Matériel et méthode . . . . .	155
6.5.1 Matériel . . . . .	155
6.5.2 Préparation des liposomes . . . . .	156
6.5.3 Ellipsométrie-PM-IRRAS . . . . .	157
6.5.3.1 Ellipsométrie . . . . .	157
6.5.3.2 PM-IRRAS . . . . .	158
6.5.4 Fuite de calcéïne . . . . .	158
6.5.5 Fluorescence de la ThT . . . . .	158
6.5.6 Expériences de PWR . . . . .	159
6.5.7 Expériences de cryo-TEM . . . . .	159
6.6 Instrumentation . . . . .	160
6.6.1 L'ellipsométrie . . . . .	160
6.6.2 La spectroscopie PM-IRRAS . . . . .	161
6.6.3 La spectroscopie PWR ( <i>Plasmon Waveguide Resonance</i> )	164
6.6.4 La fluorescence . . . . .	166
6.6.5 Microscopie champ proche . . . . .	167
6.6.5.1 Le nano-IR . . . . .	168
6.6.6 L'AFM haute-vitesse . . . . .	171
6.7 Technologies microfluidiques . . . . .	172
6.7.1 Propriétés physiques des systèmes miniaturisés . . . . .	172
6.7.1.1 Écoulement des fluides newtoniens . . . . .	172
6.7.1.2 Le nombre de Reynolds dans les microsystèmes	173
6.7.1.3 Paramètres des écoulements dans une cellule microfluidique . . . . .	174
6.7.2 La question du mélange dans les systèmes miniaturisés	175

# Liste des abréviations

---

---

<b>A<math>\beta</math></b> : Amyloïde Beta	<b>IAPP</b> : Islet Amyloid Polypeptide
<b>AD</b> : Alzheimer's Disease	<b>LFAO</b> : Large Fatty Acid-derived Oligomer
<b>AFM</b> : Atomic Force Microscopy	<b>MAPs</b> : Microtubules Associated Proteins
<b>AICD</b> : APP IntraCellular Domain	<b>nano-IR</b> : nano-spectroscopie InfraRouge
<b>APP</b> : Amyloid Protein Precursor	<b>NOA</b> : Norland Optical Adhesive
<b>ATR-FTIR</b> : Attenuated Total Reflexion-Fourier Transform InfraRed	<b>PDMS</b> : Poly(DiMethylSiloxane)
<b>BAM</b> : Brewster Angle Microscopy	<b>PGMEA</b> : Propylene Glycol Monomethyl Ether Acetate
<b>Chol</b> : Cholestérol	<b>PM-IRRAS</b> : Phase Modulation Infrared Reflection Absorption Spectroscopy
<b>Cryo-TEM</b> : Cryogenic Transmission Electron Microscopy	<b>PMMA</b> : Poly(Methyl MethAcrylate)
<b>DLS</b> : Dynamic Light Scattering	<b>PS</b> : Plaque Sénile
<b>DMPC</b> : 1,2-DiMyristoyl-sn-glycero-3-PhosphoCholine	<b>PWR</b> : Plasmon Waveguide Resonance
<b>DMPG</b> : 1,2-DiMyristoyl-sn-glycero-3-Phospho-(1'-rac-Glycerol)	<b>RMN</b> : Résonnance Magnétique Nucléaire
<b>DNF</b> : Dégénérescence NeuroFibrillaire	<b>SFAO</b> : Small Fatty Acid-derived Oligomer
<b>DOPC</b> : 1,2-DiOleoyl-sn-glycero-3-PhosphoCholine	<b>SM</b> : SphingoMyèline
<b>DOPG</b> : 1,2-DiOleoyl-sn-glycero-3-Phospho-(1'-rac-Glycerol)	<b>SPR</b> : Surface Plasmon Resonance
<b>EM</b> : Electron Microscopy	<b>SSA</b> : Systemic Senile Amyloidosis
<b>GM1</b> : Ganglioside GM1	<b>TABFO</b> : Toxic Amyloid-Beta Fibrillar Oligomer
<b>HF</b> : Hydrogen Fluoride	<b>ThT</b> : Thioflavine T
<b>HS-AFM</b> : High-Speed Atomic Force Microscopy	



# Introduction



---

Avec le vieillissement, notre société a vu se multiplier les cas de démence chez les personnes âgées. De nos jours, les démences touchent 18% des personnes âgées de plus de 75 ans et ce taux s'élève jusqu'à 45% pour les personnes de plus de 90 ans. Ces démences sont liées au développement des maladies neurodégénératives. Considérées comme le mal du XXI<sup>e</sup> siècle, ces maladies ont pour origine commune une dégénérescence des cellules neuronales. Elles se manifestent par une dégradation progressive mais irréversible des fonctions cognitives du patient. Les maladies neurodégénératives affectent plus de 47 millions de personnes à travers le monde. La plupart du temps, ces maladies évoluent si lentement qu'elles ne sont diagnostiquées qu'à l'apparition des premiers symptômes cliniques.

Les maladies neurodégénératives font partie du groupe des maladies amyloïdes ou amyloïdoses dues au mauvais repliement des protéines ou peptides. Les protéines amyloïdes ont la capacité de s'auto-assembler pour former des espèces agrégées : les fibres amyloïdes. Une caractéristique commune à la majorité de ces maladies est l'accumulation dans le tissu nerveux d'agrégats intra ou extracellulaires de ces protéines (les dépôts amyloïdes), responsables directement ou indirectement de la mort neuronale. Les maladies neurodégénératives demeurent à ce jour incurables. Dans la plupart de ces pathologies, la mutation de gènes codant les protéines amyloïdes peuvent augmenter la propension à développer la maladie. L'organisation des peptides en longues fibres est typique de la maladie et a pendant longtemps mené à l'hypothèse que ces dépôts seraient toxiques de par leur nature. Parmi ces maladies, on retrouve les maladies d'Alzheimer, de Creutzfeldt-Jacob, de Parkinson.

La maladie d'Alzheimer représente la maladie neurodégénérative la plus courante, elle est la cause de 70% des cas de démence. La maladie d'Alzheimer entraîne le déclin progressif des facultés cognitives et de la mémoire. Elle se caractérise par des troubles de la mémoire à court terme, des fonctions d'exécution et de l'orientation dans le temps et dans l'espace. Depuis sa découverte en 1907 par Alois Alzheimer, la maladie d'Alzheimer est au centre des préoccupations de la communauté scientifique qui cherche à comprendre l'origine des troubles liés à la maladie afin de développer des stratégies thérapeutiques pertinentes et efficaces. Au fil du temps de nombreuses hypothèses de toxicité ont vu le jour, suivies par la mise au point de traitements curatifs. Malheureusement aucun de ces traitements n'a montré une efficacité au niveau de l'évolution de la maladie. La principale avancée dans la compréhension du mécanisme de toxicité a vu le jour avec l'hypothèse de la cascade amyloïde. Cette hypothèse met en lumière le rôle des dépôts amyloïdes du peptide  $A\beta$ , retrouvés dans les cerveaux des patients, dans l'enchaînement des événements menant à la mort cellulaire et la démence.

Dans la maladie d'Alzheimer, il est maintenant largement admis que les dépôts de l'amyloïde- $\beta$  ( $A\beta$ ) ne sont pas directement corrélés avec la pathologie alors que la présence d'espèces solubles d' $A\beta$  apparaît être liée à la gravité de la démence [1]. In vitro, la toxicité des protéines amyloïdes dépend de leur niveau d'agrégation. Le peptide  $A\beta$  est produit à l'état de monomère dans l'organisme et s'autoassemble pour former des fibres structurées en feuillets- $\beta$  parallèles. Lorsque les peptides sont ajoutés à des cultures cellulaires, les espèces monomériques ou les fibres n'affectent pas la viabilité cellulaire alors que les oligomères mènent à sa diminution [2] [3]. La toxicité de



plusieurs oligomères solubles peut être inhibée par des anticorps structuraux spécifiques, ce qui montre que les oligomères toxiques partagent une structure commune [2]. Les propriétés physico-chimiques des oligomères toxiques ne sont pas encore bien comprises et semblent dépendre de leurs séquences primaires. Le processus de formation de ces intermédiaires est toujours en débat. Certains auteurs revendiquent que les espèces intermédiaires sont formées dans le processus de fibrillation ("*on-pathway*") [4] et d'autres suggèrent qu'il s'agit d'espèces formées lors d'un processus de fibrillation indépendant ("*off-pathway*") [5] [6].

L'équipe du professeur Cullin à l'IBGC utilise une procédure alternative décrite auparavant [5], [7] pour produire *in vivo* des peptides  $A\beta_{1-42}$  à l'état de monomères. Ils ont également mis en place un criblage génétique dans la levure afin d'isoler des mutants générés par mutagenèse aléatoire du peptide amyloïde  $A\beta_{1-42}$ . Ce procédé a permis de produire des mutants de toxicités allant d'inoffensive à très toxique pour la levure [5]. Des études récentes ont établi une corrélation entre la toxicité et la formation d'oligomères structurés en feuillets- $\beta$  anti-parallèles. [8], [9] [10] [11].

Il est maintenant largement admis que la toxicité de ces protéines est liée à leur interaction avec les membranes neuronales et que la fibrillation des amyloïdes est également influencée par les membranes. La présence de membrane peut jouer le rôle de catalyseur lors de l'auto-assemblage des amyloïdes. Leur composition et charge peuvent être de grande importance, comme par exemple la présence de cholestérol et ganglioside. L'interaction d' $A\beta$  avec les membranes est favorisée en présence de lipides anioniques. De nombreuses revues décrivent différents mécanismes possibles expliquant l'interaction entre des amyloïdes toxiques et les membranes [12] [13] [14]. Tous les mécanismes proposés sont similaires à ceux décrits pour les agents antimicrobiens tels que l'effet détergeant, effet de recouvrement (effet tapis), ou la formation de pores. Le mécanisme le plus caractérisé est la perméabilisation des membranes par formation de pores visualisée par microscopie à force atomique (AFM) ou microscopie électronique (TEM) [15]. Certains auteurs ont démontré qu'après la formation de pores par le peptide  $A\beta$ , un second mécanisme prend place, menant à la fragmentation de la membrane [16]. La toxicité des amyloïdes est liée à l'existence d'espèces intermédiaires antérieures à la formation de fibres et à leur interaction avec les membranes.

Le mécanisme moléculaire d'interaction du peptide  $A\beta_{1-42}$  avec les membranes est encore loin d'être élucidé et des contradictions importantes apparaissent dans la littérature, liées soit au peptide utilisé (souvent synthétique) et/ou aux modèles membranaires choisis. L'objectif des travaux a été de décrire plus précisément les interactions entre le peptide  $A\beta_{1-42}$  et des modèles membranaires, en utilisant des compositions lipidiques variés. La stratégie fut d'étudier le peptide  $A\beta_{1-42}$ , et également un oligomère stable (oG37C) organisé en feuillets- $\beta$  antiparallèles dont l'hypertoxicité a été mise en évidence afin d'établir une corrélation entre espèces oligomériques /feuillets- $\beta$  antiparallèles/forte perturbation des membranes/toxicité.

Ce manuscrit présente le travail que j'ai effectué durant mes trois années de thèse. Nous avons, par le biais d'un modèle oligomérique toxique, tenté de comprendre l'interaction du peptide  $A\beta_{1-42}$  avec des membranes modèles, de caractériser l'auto-assemblage des peptides et l'influence des lipides sur leur fibrillation, et d'étudier la dynamique de l'interaction.

---

Le premier chapitre présente un état de l'art sur les protéines amyloïdes et plus particulièrement sur le peptide  $A\beta$  impliqué dans la maladie d'Alzheimer et son interaction avec les membranes. Y sont aussi décrit les différents modèles peptidiques et membranaires utilisés au cours de la thèse.

Dans le second chapitre est présentée l'interaction d' $A\beta$  et des mutants avec des modèles membranaires très simples composés soit à 100% de lipides zwitterioniques (DOPC), soit à 100% de lipides anioniques (DOPG) ou d'un mélange de ces deux phospholipides par des techniques biophysiques (ellipsométrie, PM-IRRAS, *Plasmon Waveguide Resonance* PWR, fluorescence et Cryo-TEM).

Le troisième chapitre expose le protocole mis en place pour observer la morphologie et la structure secondaire des peptides  $A\beta_{1-42}$  seuls et en présence de membrane à l'échelle nanométrique avec une technique innovante : la nano-spectroscopie infrarouge. Pour ces essais, de nouvelles compositions lipidiques ont été utilisées, elles incluent la présence de gangliosides GM1 et de cholestérol : deux composants connus pour être présents dans les membranes neuronales et jouer un rôle dans la toxicité d' $A\beta$ .

Le quatrième chapitre rapporte les tentatives pour la réalisation d'une cellule microfluidique permettant un couplage avec la spectroscopie FTIR. La spectroscopie infrarouge est une technique de choix pour l'étude des protéines et de leur interaction avec des membranes. Elle permet d'une part d'évaluer la structure secondaire des protéines et d'autre part la structure des lipides. Le couplage avec la microfluidique permettrait un suivi in situ de l'assemblage des peptides et des interactions avec les membranes.

Enfin, dans le cinquième chapitre, sont rapportés les résultats obtenus en AFM haute-vitesse sur l'interaction des peptides  $A\beta_{1-42}$  et mutants avec des membranes modèles contenant GM1 et cholestérol en temps réel et les changements morphologiques induits par l'interaction. En faisant varier les compositions lipidiques, nous pourrions établir l'importance des composés formant la membrane et leur rôle dans l'interaction avec les peptides.

Le manuscrit se termine par des annexes où sont détaillés les différents matériels et méthodes expérimentales utilisés dans nos études.



# Chapitre 1

## État de l'art



## 1.1 Maladies amyloïdoses

Les amyloïdoses sont des maladies associées à un dépôt extra cellulaire anormal de fibres protéiques, dit plaque amyloïde, lié au mauvais repliement de protéines fonctionnelles solubles [17]. Le physicien allemand Rudolf Virchow, en 1854, désigna par le terme "amyloïde" des masses cérébrales anormales adoptant une coloration bleu pâle après traitement à l'iode et qui devenaient violettes après l'addition d'acide sulfurique. Ces dépôts extracellulaires, ont tout d'abord été associés par Virchow à la cellulose, la distinction entre amidon et cellulose n'étant pas claire à cette époque [18](fig 1.1).

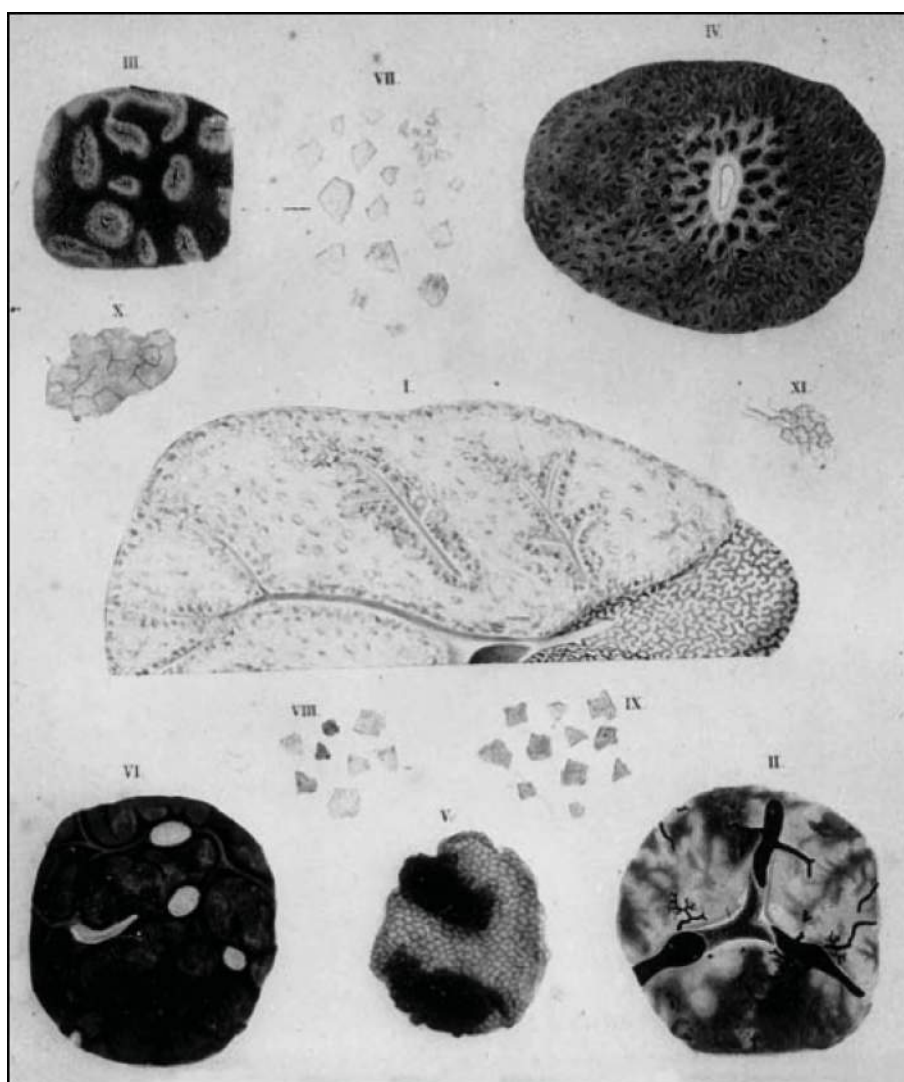


FIGURE 1.1 – Schémas de dépôts amyloïdes pathologiques attribués à Frerichs (1862)(Sipe *et al*, 2000).

Cette hypothèse fut abandonnée en 1859, lorsque Friedreich et Kekule découvrent, en disséquant la rate d'un patient atteint d'amyloïdose, la nature protéique de ces dépôts extracellulaires [19]. Ce n'est qu'un siècle plus tard qu'ont pu être identifiées les différentes protéines constituant les dépôts grâce à l'amélioration des techniques de purification par Pras *et al* en 1968 [20] [21](table 1.1).

Table I. Amyloid fibril proteins and their precursors in humans.\*

Amyloid protein	Precursor	Systemic (S) or localized, organ restricted (L)	Syndrome or involved tissues
AL	Immunoglobulin light chain	S, L	Primary Myeloma-associated
AH	Immunoglobulin heavy chain	S, L	Primary Myeloma-associated
A $\beta_2$ M	$\beta_2$ -microglobulin	S	Hemodialysis-associated
ATTR	Transthyretin	L?	Joints
		S	Familial
		L?	Senile systemic
AA	(Apo)serum AA	S	Tenosynovium
AApoAI	Apolipoprotein AI	S	Secondary, reactive
		L	Familial
AApoAII	Apolipoprotein AII	S	Aorta, meniscus
AApoAIV	Apolipoprotein AIV	S	Familial
AGel	Gelsolin	S	Sporadic, associated with aging
ALys	Lysozyme	S	Familial (Finnish)
AFib	Fibrinogen $\alpha$ -chain	S	Familial
ACys	Cystatin C	S	Familial
ABri	ABriPP	S	Familial dementia, British
ALect2	Leukocyte chemotactic factor 2	S	Mainly kidney
ADan*	ADanPP	L	Familial dementia, Danish
A $\beta$	A $\beta$ protein precursor (A $\beta$ PP)	L	Alzheimer's disease, aging
APrP	Prion protein	L	Spongiform encephalopathies
ACal	(Pro)calcitonin	L	C-cell thyroid tumors
AIAPP	Islet amyloid polypeptide**	L	Islets of Langerhans
			Insulinomas
AANF	Atrial natriuretic factor	L	Cardiac atria
APro	Prolactin	L	Aging pituitary
			Prolactinomas
AIns	Insulin	L	Iatrogenic
AMed	Lactadherin	L	Senile aortic, media
AKer	Kerato-epithelin	L	Cornea, familial
ALac	Lactoferrin	L	Cornea
AOaap	Odontogenic ameloblast-associated protein	L	Odontogenic tumors
ASemI	Semenogelin I	L	Vesicula seminalis

\*Proteins are listed, when possible, according to relationship. Thus, apolipoproteins are grouped together, as are polypeptide hormones.

†ADan comes from the same gene as ABri.

‡Also called 'amylin'.

TABLE 1.1 – Protéines amyloïdes pathologiques et leur précurseurs chez l'humain (Sipe *et al*, 2010).

Actuellement, on recense 27 maladies caractérisées par un dépôt extra cellulaire de fibres amyloïdes [21]. Ces maladies peuvent être héréditaires, liées à l'âge ou infectieuses (les maladies à prions [22] [23]). Parmi ces maladies, on retrouve les maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson ou la maladie d'Alzheimer.

## 1.2 La maladie d'Alzheimer

### 1.2.1 Impacts sociaux économiques

La maladie d'Alzheimer représente 70% des cas de démences et touche 25 millions de personnes à travers le monde.

Moins de 2 % des cas de maladie d'Alzheimer surviennent avant 65 ans, essentiellement chez des personnes atteintes de formes familiales héréditaires. Après 65 ans, la fréquence de la maladie s'élève de 2 à 4 % de la population générale, augmentant rapidement pour atteindre 15 % à 80

ans (dossier Inserm, juillet 2014 [24])

D'après le rapport de l'association *Alzheimer's Disease International* publié en 2015 [25], plus de 25 millions de personnes sont actuellement atteintes par la maladie d'Alzheimer. Ce nombre pourrait augmenter pour atteindre 131,5 millions en 2050.

La population mondiale vieillissante et les conséquences économiques de la maladie d'Alzheimer en font une priorité de santé publique. En effet, le coût mondial de la maladie est estimé à 818 milliard de dollars (environ 726 milliard d'euros) [25].

### 1.2.2 Historique

La maladie d'Alzheimer est identifiée lorsque qu'un médecin allemand, Aloïs Alzheimer, décrit en 1907 les résultats de ses études post-mortem sur une patiente de 51 ans souffrant d'une démence progressive pré-sénile [26]. L'étude présente le cas d'une patiente ayant développé une perte rapide de la mémoire, des troubles de l'orientation (spatiale et temporelle) et des hallucinations [27]. Le cas de cette femme était inusuel de part son âge et ne pouvait donc pas être répertorié parmi les démences séniles connues.

La patiente mourra après 4 ans et demi de maladie progressant jusqu'à la perte totale d'autonomie. L'observation post-mortem des tissus cérébraux de la patiente a permis de mettre en évidence un cerveau atrophique et la présence de dégénérescences neurofibrillaires. Alzheimer décrivait aussi la présence de dépôts extracellulaires ; les plaques amyloïdes.

### 1.2.3 Critères cliniques

Dans le but de différencier la maladie d'Alzheimer des autres causes de démences, telles que les démences vasculaires, des critères cliniques ont été établis. Castellani *et al* répertorient les principales étapes du diagnostique [28](table 1.2) :

#### NINCDS/ADRDA clinical criteria for AD.

- 
- |             |   |
|-------------|---|
| <b>I.</b>   | AD is characterized by progressive decline and ultimately loss of multiple cognitive functions, including both:<br><u>Memory impairment</u> --impaired ability to learn new information or to recall previously learned information.<br><u>And at least one of the following:</u><br>Loss of word comprehension ability, for example, inability to respond to "Your daughter is on the phone." (aphasia);<br>Loss of ability to perform complex tasks involving muscle coordination, for example, bathing or dressing (apraxia);<br>Loss of ability to recognize and use familiar objects, for example, clothing (agnosia);<br>Loss of ability to plan, organize, and execute normal activities, for example, going shopping. |
| <b>II.</b>  | The problems in "I" represent a substantial decline from previous abilities, cause significant problems in everyday functioning, and begin slowly and gradually, becoming more severe.  |
| <b>III.</b> | The problems in "I" are <u>not</u> due to other conditions that cause progressive cognitive decline (e.g., stroke, Parkinson's disease, Huntington's chorea, brain tumor, etc.), and other conditions that cause dementia (e.g., hypothyroidism, HIV infection, syphilis, and deficiencies in niacin, vitamin B12, and folic acid), not caused by delirium, and not caused of another mental illness such as depression or schizophrenia.   |
- 

TABLE 1.2 – Critères cliniques de diagnostique de la maladie d'Alzheimer, Castellani *et al* [28].

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par un déclin progressif et jusqu'à perte totale de la mémoire et de plusieurs autres fonctions cognitives (aphasie, apraxie, agnosie...) conduisant à la



perte totale d'autonomie. D'autres symptômes peuvent apparaître au cours de la maladie comme observé par Alzheimer [27] : incontinence, dépression, mutisme... La progression de la maladie entraîne un état végétatif menant à la mort, la plupart du temps des suites de pneumonies [28].

### 1.2.4 Histopathologie

La distinction entre les pathologies liées à la maladie d'Alzheimer et les pathologies qui découlent du vieillissement sont extrêmement complexes à clairement identifier. Dans une étude de Brayne *et al* en 2009 où des neuropathologistes devaient établir un diagnostic sur le cerveau de patients sans en connaître les données cliniques, 76 % des patients âgés (75 ans et plus) ont été diagnostiqués avec la maladie d'Alzheimer alors qu'ils ne présentaient pas les symptômes cliniques de la maladie [29]. Le rôle des études clinico-pathologiques est de corréler les origines cliniques et biologiques des processus pathologiques. En principe, la gravité de la pathologie observée doit être corrélée à l'étendue de la maladie, la perte de mémoire dans le cas de la maladie d'Alzheimer [30].

Depuis sa découverte en 1907 par Alois Alzheimer, la maladie d'Alzheimer est caractérisée par deux lésions neuropathologiques typiques : les plaques séniles extracellulaires composées principalement du peptide  $A\beta$  et les agrégats neurofibrillaires intracellulaires constitués de la protéine Tau hyperphosphorylée (fig 1.2) [31] [30] [28] [32].

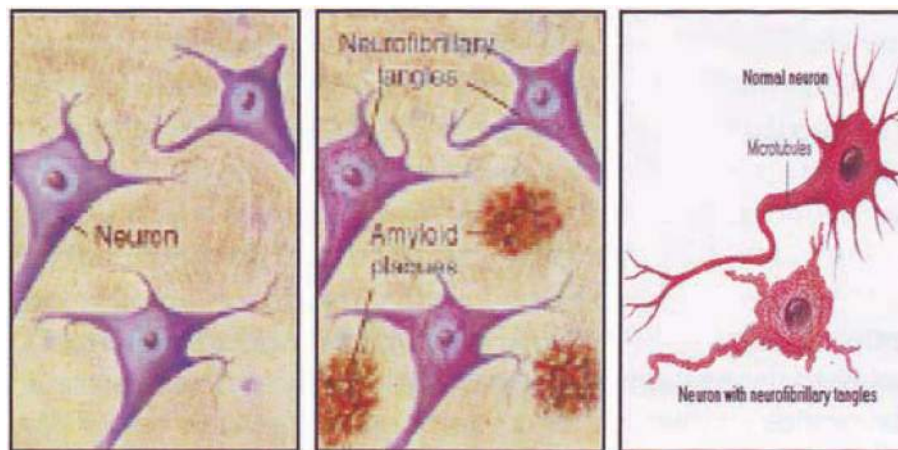


FIGURE 1.2 – Schémas des neurones dans un cerveau sain et dans un cerveau atteint par la maladie d'Alzheimer avec la présence de plaques séniles et de dégénérescences neurofibrillaires, proposé par Mahdi *et al* [33].

En 1985, Khachaturian *et al* établissent de nouveaux critères quantitatifs permettant de faire la distinction entre la maladie d'Alzheimer et les démences séniles [34]. Selon ces nouveaux critères (table 1.3), l'étendue des plaques amyloïdes est quantifiée et les résultats sont corrélés à l'âge des patients de sorte que les patients les plus âgés doivent présenter plus de lésions pour que le diagnostic de la maladie d'Alzheimer soit posé.

## Khachaturian Criteria for AD.

- 
- Age less than 50
    - The number of senile or neuritic plaques, and of NFT anywhere in the neocortex should exceed two to five per field (200X magnification)
  - Age 50 to 65
    - There may be some NFTs, but the number of senile plaques must be eight or greater per field.
  - Age 66 to 75
    - Some NFTs may again be present, but the number of senile plaques must be greater than 10 per field.
  - Older than 75
    - NFTs may sometimes not be found in the neocortex, but the number of senile plaques should exceed 15 per field.
  - Caveat:
    - "In the presence of a positive clinical history of AD these criteria should be revised downwards, although to what extent remains to be determined by further research. One suggestion was that one might only need 50% as many lesions in neocortical samples to retain a high confidence for the histological diagnosis."
- 

TABLE 1.3 – Critères de diagnostique de la maladie d'Alzheimer basés sur la pathologie établis par Kachaturian *et al* en 1985 [28].

#### 1.2.4.1 Les Dégénérescences NeuroFibrillaires (DNF)

Les dégénérescences neurofibrillaires sont les lésions microscopiques majoritaires de la maladie d'Alzheimer. Elles sont composées d'agrégats fibreux anormaux de la protéine Tau qui s'accumulent dans la partie centrale des neurones (le péricaryon, autour du noyau), les axones et les dendrites (fig 1.3) [30].

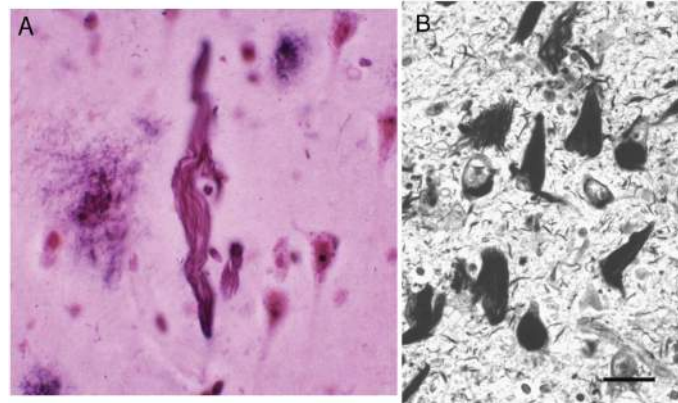


FIGURE 1.3 – DNF après coloration de Bielchowsky (coloration à l'argent) [28] [32].

Les DNF ne sont pas spécifiques de la maladie d'Alzheimer, on les retrouve dans quelques démences frontotemporales, maladies à prion et d'autres maladies du cerveau. La protéine Tau elle-même peut entraîner des maladies neurodégénératives appelées "tauopathies". Les dégénérescences neurofibrillaires sont utilisées pour caractériser l'avancée de la maladie [32] [28]. Les protéines Tau font parties des "MAPs" (*Microtubules Associated Proteins*) dont le rôle est de stabiliser les microtubules. Les microtubules font partis du cytosquelette neuronal avec les microfilaments et les neurofilaments. La localisation de Tau dépend du stade de développement des neurones, Tau est présent dans toutes les parties du neurone en développement. La phosphorylation de Tau modifie la fonction de Tau en diminuant sa capacité à se lier aux microtubules [30].

Cette dissociation est reliée à son agrégation sous forme amyloïde.

#### 1.2.4.2 Les plaques amyloïdes

Décrites dans le rapport original d'Alzheimer en tant que "*miliary foci*", les plaques amyloïdes sont des lésions extracellulaires de diamètres entre 10 et 200  $\mu\text{m}$  (fig 1.4) [28]. Le constituant majoritaire des plaques amyloïdes est le peptide  $A\beta$  [35]. Les plaques séniles sont distribuées majoritairement dans le cortex cérébral. Des dépôts d' $A\beta$  sont aussi observés dans les parois des vaisseaux cérébraux (angiopathie amyloïde) et sous la forme de dépôts non fibrillaires dans le neuropile (axones, dendrites, synapses...) ce qui est considéré comme des états précoces des plaques séniles [30].

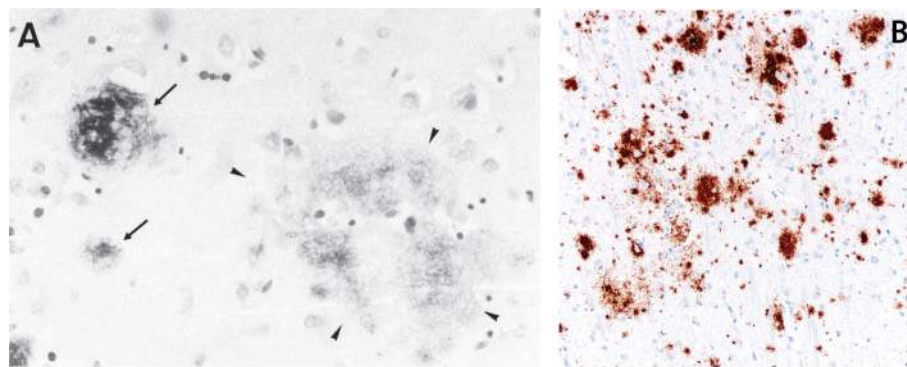


FIGURE 1.4 – Plaques amyloïdes chez un patient atteint de la maladie d'Alzheimer. A) Par immunomarquage avec un anticorps anti-amyloïde  $A\beta$  [30]. B) Par coloration au rouge Congo [28].

Contrairement aux dégénérescences neurofibrillaires, les dépôts d' $A\beta$  sont généralement limités à la maladie d'Alzheimer. Les plaques extracellulaires retrouvées dans le cerveau de patient atteint de la maladie sont principalement constituées du peptide amyloïde  $A\beta$  possédant 42 résidus  $A\beta_{1-42}$ .

Suite à la découverte dans les années 90 d'une mutation pathogène de la protéine précurseur des amyloïdes APP (*Amyloid Protein Precursor*) qui mène à la libération de la protéine  $A\beta$ , des études menées par deux équipes en parallèle, Hardy et Selkoe, proposent que la mutation de l'APP et les dépôts des amyloïdes  $\beta$  sont les événements primaires du processus entraînant la maladie d'Alzheimer. Ils appellent ce processus l'hypothèse de la cascade amyloïde [36] [37] [38].

#### 1.2.5 La cascade amyloïde

L'hypothèse de la cascade amyloïde suggère que les dépôts amyloïdes observés dans le cerveau est la cause de la maladie d'Alzheimer cela implique donc que l'élimination de ces dépôts empêcherait le développement de la maladie.

La cascade pathologique entraînant la maladie d'Alzheimer suivrait le processus suivant : dépôts d'amyloïde- $\beta$   $\rightarrow$  phosphorylation de Tau et formation de dégénérescence neurofibrillaire  $\rightarrow$  mort neuronale. Comme le principal composant des plaques séniles est le peptide  $A\beta$ , il semblerait que ce peptide soit à l'origine du processus inflammatoire entraînant la formation de dépôts [36] [39].

Le mécanisme pathogénique proposé par Hardy débute par la formation du peptide  $A\beta$  et son dépôt suivi par la formation de la dégénérescence neurofibrillaire jusqu'à la mort cellulaire et les symptômes cliniques (fig 1.5). La démence découlerait de la perturbation des connexions synaptiques associée à la formation des plaques séniles et de la mort des neurones dans lesquels sont déposés les DNF. La formation de ces dernières serait le résultat d'un déséquilibre entre la production et l'élimination d' $A\beta$  [40].

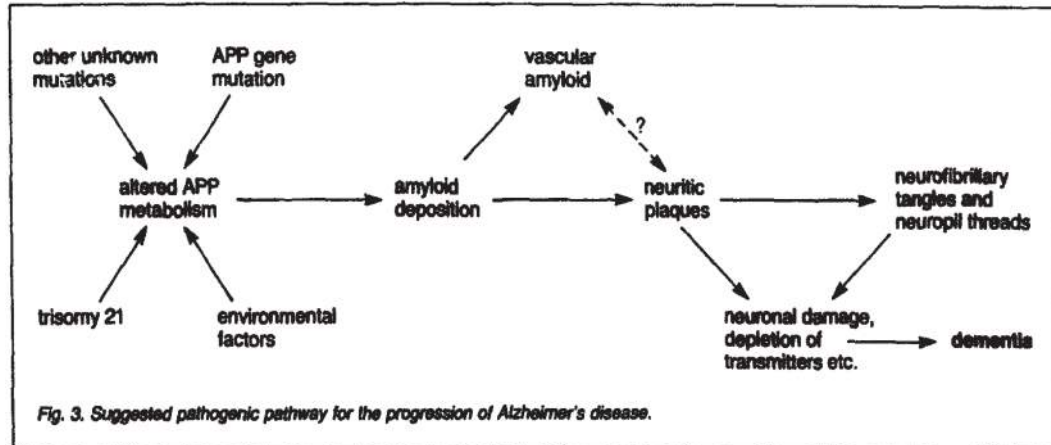


FIGURE 1.5 – Schéma de cascade amyloïde suggéré par Hardy en 1991 [36].

Ces dernières années, de nombreuses études ont montré les faiblesses de l'hypothèse de la cascade amyloïde [40] [41] [42] [43]. Les principales limitations de l'hypothèse relevées par les auteurs sont [41] :

1. les plaques séniles (PS) et les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) peuvent se former de manière indépendante
2. les PS et les DNF seraient le produit plutôt que la cause de la maladie d'Alzheimer
3. il n'y aurait pas de corrélation entre les PS et les DNF et la sévérité de la démence
4. les modèles murins utilisés pour faire les observations menant à l'hypothèse de la cascade amyloïde ne miment pas tous les aspects de la maladie d'Alzheimer
5. les traitements basés sur cette hypothèse n'ont pas montré des résultats probants

Malgré ces limitations, l'hypothèse de la cascade amyloïde reste toujours d'actualité. De nouveaux modèles ont été proposés avec l'apparition de nouvelles espèces neurotoxiques : les espèces oligomériques [40]. Hardy et Selkoe proposent en 2002 une nouvelle séquence d'événements pathogènes menant à la maladie d'Alzheimer (fig 1.6).

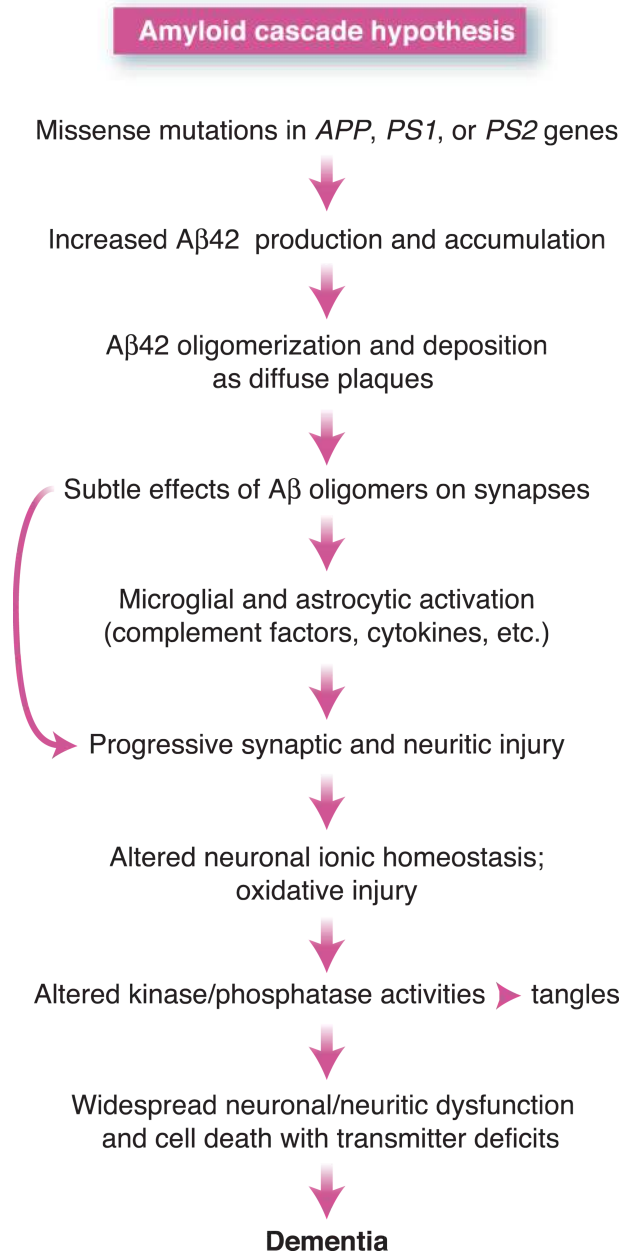


FIGURE 1.6 – Séquence d'événements pathogènes, menant à la maladie d'Alzheimer, proposée par l'hypothèse de la cascade amyloïde. Version revisitée par Hardy et Selkoe [40].

Le déclenchement de la maladie est lié à la production et l'accumulation du peptide Aβ.

### 1.2.6 Le peptide Aβ

Le peptide Aβ est issu du clivage de la protéine transmembranaire APP (*APP*, *Amyloid Precursor Protein*).

### 1.2.6.1 La protéine *APP* (*Amyloid Precursor Protein*) : précurseur de l'amyloïde

L'APP est une glycoprotéine transmembranaire ubiquitaire, majoritairement exprimée dans les neurones, composée d'une importante région extracellulaire et d'un court fragment intracellulaire [44]. L'APP est codée par un gène porté par le chromosome 21 ce qui peut expliquer la propension des personnes atteintes de trisomie 21 à développer la maladie d'Alzheimer.

Bien que sa fonction ne soit pas totalement élucidée, des études montrent que l'APP jouerait un rôle dans l'adhésion, l'activité liée au développement et à la prolifération des tissus neuro-naux, la communication intra-cellulaire et la signalisation membrane-noyau [45]. APP n'est pas limitée au cerveau mais se retrouve dans quasiment tout le corps avec différents ratios d'isoformes présents dans certains types de tissus [46].

L'APP peut être clivée par deux grandes voies : la voie non-amyloïdogénique, ne produisant pas de peptides amyloïdes et la voie amyloïdogénique à l'origine de la formation des peptides amyloïdes (fig 1.7) [47].

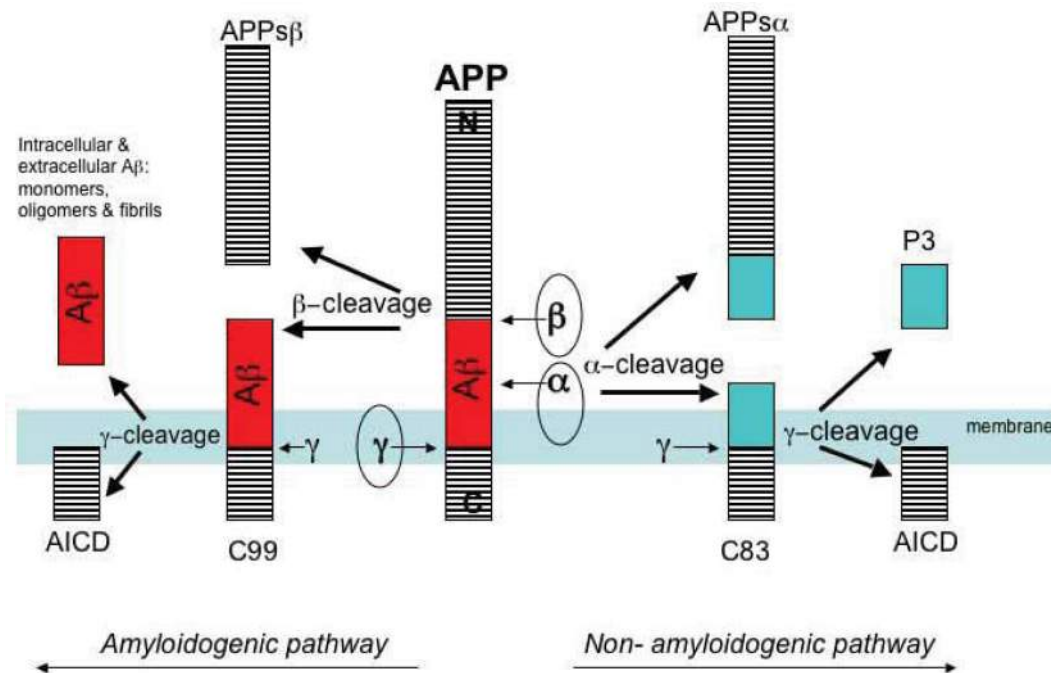


FIGURE 1.7 – Voie de clivage de la protéine APP par les différentes sécrétases.

Dans la voie non-amyloïdogénique, APP est clivée successivement par l' $\alpha$ -sécrétase libérant un fragment de l'APP dans le milieu extracellulaire (APPs $\alpha$ ) puis la  $\gamma$ -sécrétase produisant le domaine AICD dans le milieu intracellulaire et le peptide p3 dans le milieu extracellulaire. Dans la voie amyloïdogénique, l'APP est d'abord clivée par la  $\beta$ -sécrétase libérant un fragment soluble (APPs $\beta$ ) puis par la  $\gamma$ -sécrétase produisant les peptides A $\beta$  en milieu extracellulaire ainsi que les fragments AICD. En conditions physiologiques, dans la plupart des cellules la voie non-amyloïdogénique représente 90% de la protéolyse de l'APP.

Les différents processus de clivage amyloïdogénique aboutissent à la production de peptides d'A $\beta$  : majoritairement A $\beta_{1-40}$  et A $\beta_{1-42}$  [48].

### 1.2.6.2 $A\beta_{1-40}$ *versus* $A\beta_{1-42}$

La  $\gamma$ -sécrétase entraîne la production majoritaire des deux formes d' $A\beta$  :  $A\beta_{1-40}$  et  $A\beta_{1-42}$ . Des études ont montré que le peptide le plus abondant dans le cerveau est  $A\beta_{1-40}$  mais que les dépôts amyloïdes sont formés des deux isoformes d' $A\beta$ ,  $A\beta_{1-40}$  et  $A\beta_{1-42}$ . Les isoformes présentent des caractéristiques de solubilité et de fibrillation différentes. Le peptide  $A\beta_{1-40}$  est plutôt soluble alors que le variant  $A\beta_{1-42}$  en solution forme rapidement des structures insolubles de type fibrillaire. De plus, il a été montré que le développement de la maladie d'Alzheimer et l'apparition des symptômes étaient corrélés à une augmentation de la quantité d' $A\beta_{1-42}$ . Dans le cerveau de patients non-déments le ratio est inversé avec une plus grande proportion d' $A\beta_{1-40}$  [49] [50] [51].

Le peptide  $A\beta$  est un membre d'une famille plus importante de protéines capables de former des structures amyloïdes. Le chapitre suivant va nous permettre de donner un certain nombre d'informations communes à toutes ces protéines.

## 1.3 Les amyloïdes

### 1.3.1 Des peptides qui s'auto-assemblent spontanément

Depuis la découverte d'une corrélation entre la capacité d'agrégation de certaines protéines et le développement de maladie chez l'homme, la caractérisation biophysique des états de mauvais repliements des protéines et leur mécanisme d'agrégation ont été très étudiés avec l'idée que l'agrégation est liée à la pathogenèse [52] [53].

Depuis les années 70, le repliement des protéines était décrit par deux concepts : le paradoxe de Levinthal et la nécessité des intermédiaires de repliement. Levinthal propose que puisqu'il existe une possibilité astronomique de conformations, le repliement des protéines passant par tous ces états prendrait une éternité, il doit donc y avoir des voies définies simplifiant les choix de repliement [54].

Dans les années 90, le développement de nouvelles méthodes expérimentales et théoriques en ingénierie des protéines et en Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ont permis de faire évoluer les idées sur les voies de repliement des protéines et de décrire tous les états (stables et transitoires) de ce processus à la résolution atomique [55]. L'idée de "cinétique de repliement" remplace celle de "voie de repliement" incluant les notions de paysage énergétique et de chemin de repliement [56] [57] [58]. Ce formalisme théorique décrit la progression de mauvais repliement des chaînes polypeptidiques selon un paysage énergétique vers leur structure native compacte (fig 1.8).

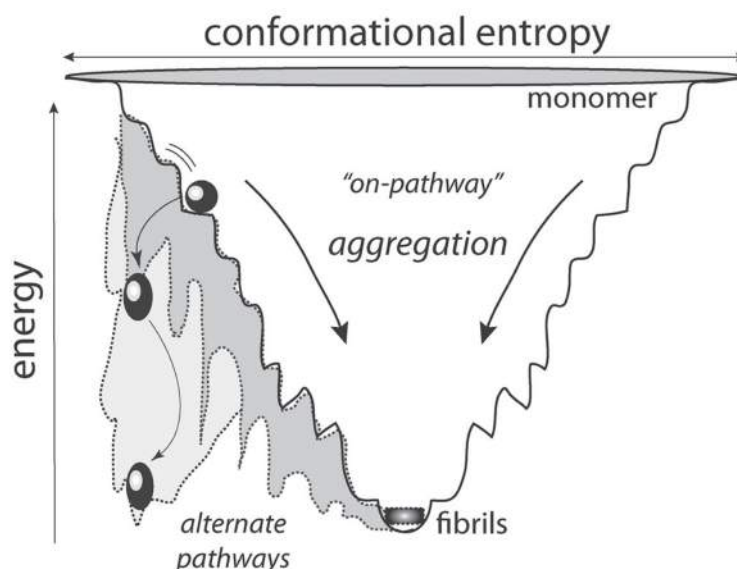


FIGURE 1.8 – Schéma d'un paysage énergétique du repliement d'une protéine et son agrégation. D'après Kumar *et al* [59].

La formation des amyloïdes peut être considérée comme impliquant trois étapes principales [60] :

1. des changements de conformation différents de l'état natif dans des régions clés de la protéine
2. des interactions intermoléculaires impliquant la formation d'intermédiaires agrégés
3. une plus grande agrégation en trois dimensions produisant les fibrilles capables de croître.

Les fibres amyloïdes font parties des différents types d'agrégats que peuvent former les peptides. Ces espèces ont une structure hautement organisée grâce à des liaisons hydrogènes qui leur confèrent une grande stabilité thermodynamique. Pour cette raison, une fois formés, ces agrégats insolubles résistants peuvent persister longtemps ce qui permet aux dépôts de se développer dans les tissus et ainsi donne la possibilité aux espèces de la même protéine de se lier aux fibres déjà formées [58].

Nilsson, en 2004, propose des critères pour l'identification des fibres amyloïdes *in vitro*. Le schéma possible de classification suit trois critères [61] :

- La morphologie des fibres
- Les fibres qui sont entièrement structurées en hélices- $\alpha$  sont exclues
- Un score total de 4 doit être atteint en satisfaisant une combinaison de critères suivants (table 1.4) :



Caractéristiques	Scores pour un test positif
Structure secondaire en feuillets- $\beta$	2
Affinité pour le rouge Congo (via des observations microscopiques ou spectroscopiques)	2
Affinité pour la Thioflavine ( T ou S)	2
Formation de gel	1
Intermédiaires protofibrillaires ou cinétiques accélérées par la présence de fragments fibrillaires	1
Faible solubilité aux dénaturants ou résistance à la protéase	1

TABLE 1.4 – Critères de classification des protéines amyloïdes selon Nilsson [61].

Les dépôts amyloïdes partagent des caractéristiques optiques spécifiques telles que la biréfringence ou la capacité à s'associer à certains colorants (le rouge Congo). Ils présentent des morphologies similaires et une structure caractéristique en feuillets- $\beta$ . Deux aspects des fibres amyloïdes peuvent être caractérisés *in vitro* ; la détermination de la structure de la fibre et son processus d'auto-assemblage.

### 1.3.2 Cinétique de formation des fibres

Le modèle de croissance des fibres amyloïdes généralement accepté suit un profil de nucléation-élongation où l'étape limitante est la formation d'un noyau par auto-association de monomères. Cette étape lente est suivie par une croissance rapide par addition de monomères au noyau menant à la formation de fibrilles [60] [62]. La première étape appelée phase de latence correspond à l'étape thermodynamiquement défavorable alors que l'addition de monomères au noyau est un processus thermodynamiquement favorable. En terme énergétique, le processus de fibrillation peut être séparé en trois étapes [60] [63] [64] :

1. formation d'oligomères solubles
2. formation de fibrilles
3. allongement rapide des fibres par association de monomères ou oligomères aux extrémités des fibrilles

La cinétique de formation des fibres amyloïdes est généralement mesurée *in vitro* par la fixation de la Thioflavine T [65] [66] [67]. On mesure alors l'augmentation de la fluorescence au cours du temps (fig 1.9).

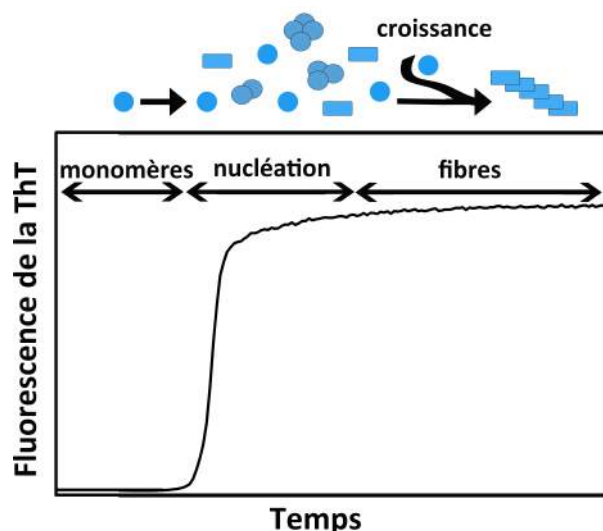


FIGURE 1.9 – Schéma de cinétique de fibrillation des peptides amyloïdes par suivi de la fluorescence de la Thioflavine T.

En 1993, LeVine utilise la Thioflavine T comme une sonde pour la quantification de la quantité relative des agrégats d'A $\beta$  en solution et pour mesurer la formation de fibres. LeVine observe dans son étude l'apparition d'un nouveau pic d'excitation à 450 nm, après interaction de la ThT avec des fibres amyloïdes, responsable d'une augmentation de l'émission de fluorescence à 482 nm [68](fig 1.10).

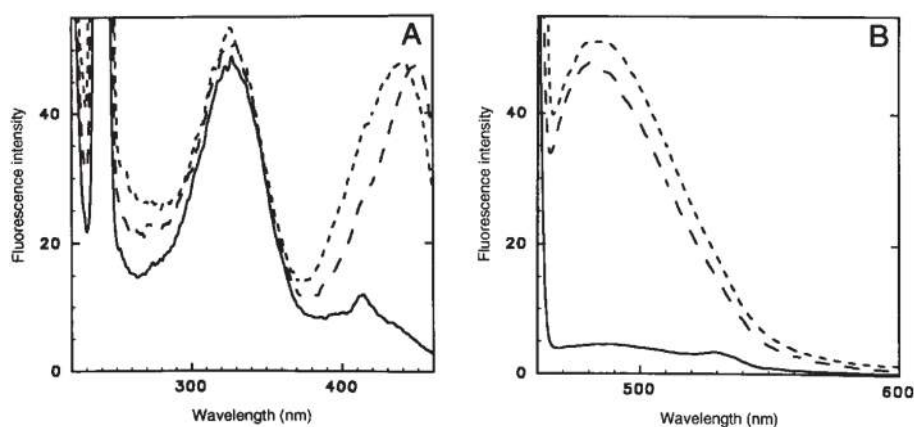


FIGURE 1.10 – Spectres de fluorescence de la Thioflavine T en présence (tracé pointillé) et en absence (ligne pleine) de peptides amyloïdes ( $\beta_{1-28}$  et  $\beta_{1-40}$ ) : A) spectre d'excitation avec apparition d'un pic à 450 nm, B) spectres d'émission correspondants (d'après LeVine [68]).

Les amyloïdes colorés avec la Thioflavine T (ThT) présentent une fluorescence jaune sous lumière UV.

### 1.3.3 Caractérisation des fibres par leur propriété tinctoriale

L'utilisation de colorants plus ou moins spécifiques est intimement liée à la caractérisation des amyloïdes. Le rouge Congo fait partie de ces colorants.

Le rouge Congo, synthétisé pour la première fois en 1884, était utilisé originellement pour teindre les textiles en rouge, ce qui est lié à sa fixation sur les fibres de cellulose selon une

orientation préférentielle [69] [70]. Le physicien Hans Hermann Bennhold fût le premier à utiliser le rouge Congo pour le diagnostic d'amyloïdoses (1922). Cohen *et al* ont démontré en 1959 une biréfringence positive de protéines amyloïdes, après coloration au rouge Congo, traduisant une organisation moléculaire et non une structure amorphe [71] [72] [73]. L'attachement du rouge Congo aux fibres amyloïdes induit un décalage caractéristique du maximum d'absorbance de 490 nm à 540 nm [74].

La biréfringence vert pomme (jaune-vert) observée sous lumière polarisée (fig 1.11) par fixation du rouge Congo dépend de la configuration du feuillet- $\beta$  des fibres. La configuration permet aux molécules colorantes, qui sont planes, de s'ajuster aux côtés et/ou entre les feuillets- $\beta$  avec leur axe long selon l'axe du filament [75] [74] [76] [77]. Les propriétés optiques du rouge Congo présentent une certaine sensibilité et spécificité qui peut mener à de faux positifs (épaisseur de la coupe ou présence de collagène) [17] [61].

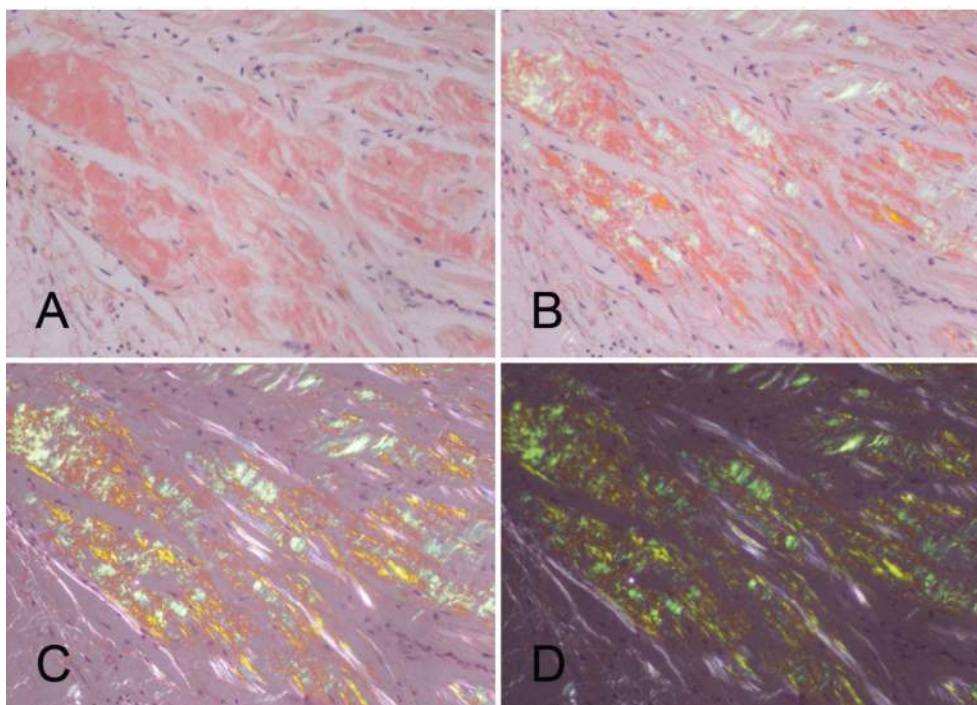


FIGURE 1.11 – Coloration au rouge Congo d'amyloïdes présents dans le tissu cardiaque d'un patient atteint d'amyloïdose systémique sénile (SSA). Couleur rouge (A) de l'amyloïde qui devient progressivement (B, C) vert (D) sous lumière polarisée (d'après Tanskanen *et al* [77]).

Ce colorant n'est pas très sensible et ne permet pas un suivi continu de l'agrégation comme la ThT.

### 1.3.4 Structure secondaire en feuillets- $\beta$

La première structure d'une protéine amyloïde contenue dans les filaments des oeufs des insectes *Chrysopa* a été résolue en 1968 par diffraction des rayons-X par Geddes *et al* [78]. Geddes identifie une structure en "cross- $\beta$ " : la chaîne polypeptidique se replie sur elle-même pour former un feuillet- $\beta$  perpendiculaire à l'axe principal de la fibre, et des rubans- $\beta$  associés

face à face forment la largeur de la fibre [60] [79]. La structure en cross- $\beta$  des fibres est alors établie comme étant un critère structural commun à tous les peptides amyloïdes [80] [60].

La structure des fibres amyloïdes est caractérisée par un profil de diffraction des rayons-X unique. On peut y observer un premier halo ; l'arc méridional à 4,7 Å correspondant à la distance inter-brins  $\beta$  avec les chaînes peptidiques à 90° de l'axe de la fibre. Le second halo ; l'espacement équatorial à 10 Å correspond à la distance entre les feuillets- $\beta$  et varie en fonction de la composition de la chaîne latérale [60] [76] [81] [82] (fig 1.12).

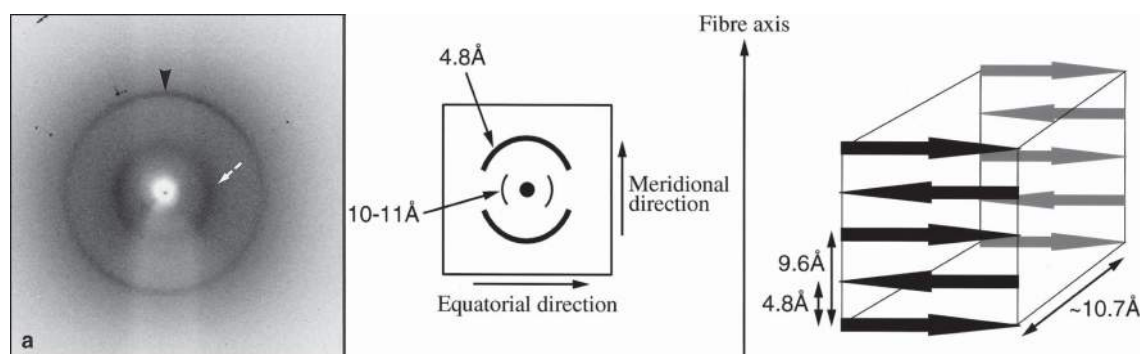


FIGURE 1.12 – Profil de diffraction des rayons-X de l'amyloïde  $A\beta_{1-40}$  (a) et schéma représentant l'espacement caractéristique en cross- $\beta$  des fibres amyloïdes observées par diffraction des rayons-X (d'après Serpell [82]).

Ces observations sont en accord avec les spectres obtenus en dichroïsme circulaire, Résonance Magnétique Nucléaire ou en spectroscopie FTIR confirmant une forte teneur en feuillets- $\beta$  [60] [83] [84] (fig 1.13).

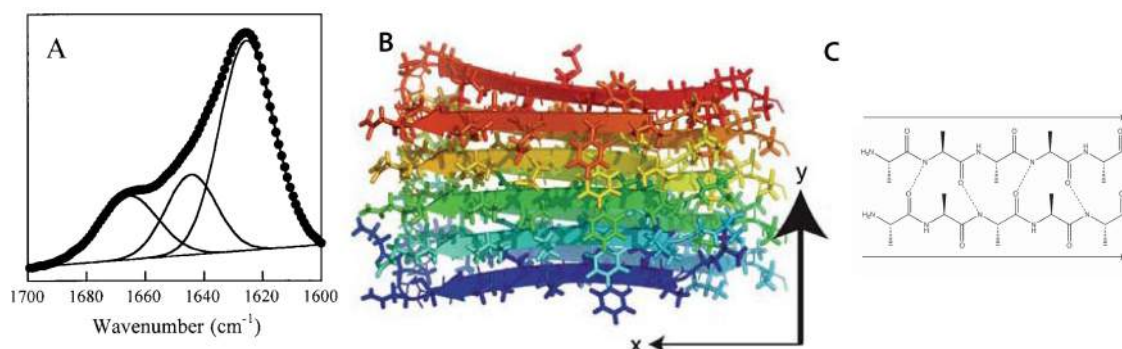


FIGURE 1.13 – Structure cross- $\beta$  des fibres amyloïdes : A) Spectres FTIR de fibres d'amyline (zone amide I) d'après Nilsson [83], B) Structure d' $A\beta_{18-42}$  par RMN du solide d'après Luhr [84] et C) Schéma de l'organisation des feuillets- $\beta$  parallèles [60].

### 1.3.5 Morphologie fibrillaire

En 1959, pour la première fois, les protéines amyloïdes ont été reconnues pour avoir des caractéristiques structurales microscopiques similaires, indépendamment de leurs origines diverses [80].

La microscopie électronique et la microscopie à force atomique sont des techniques performantes pour caractériser la structure macromoléculaire des amyloïdes. Les protofilaments sont

des sous-unités fibrillaires comprenant les fibres amyloïdes et sont clairement visibles sur les micrographes [76](fig 1.14).

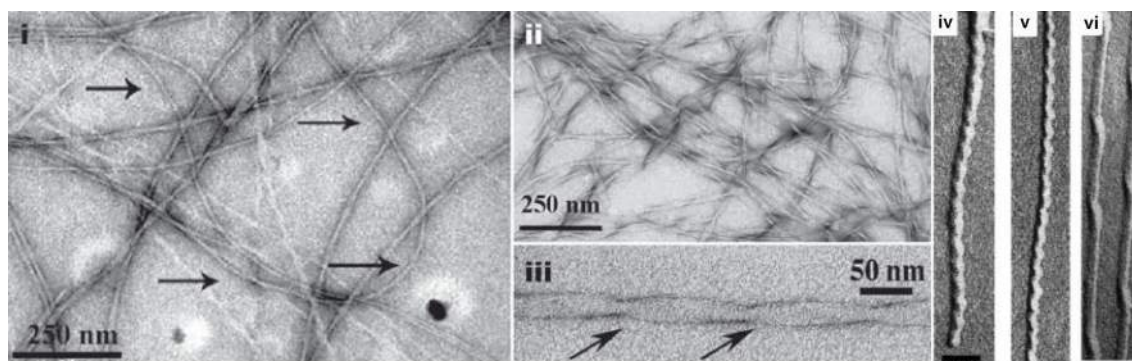


FIGURE 1.14 – Micrographes typiques de fibres amyloïdes montrant leur nature linéaire, non-ramifiée et flexible (i-iii), images de microscopie électronique des fibres d'A $\beta$  (iv et vi) et d'amyline (v) montrant des structures de type ruban où câble et tournant vers la gauche avec un pas de 25 nm. Extrait de [85].

Les fibres amyloïdes observées en microscopie électronique sont rigides, non ramifiées et d'un diamètre compris entre 10 et 15 nm. Chaque fibre est composée de 2 à 5 filaments enroulés en une structure de câble ou associés latéralement pour former un ruban [76] [85].

## 1.4 Formes toxiques d'A $\beta$

Comme présenté auparavant, les amyloïdes provenant de différentes maladies partagent une voie commune pour la formation des fibres dont l'événement déclencheur est le mauvais repliement ou la dénaturation des protéines mises en jeu. Lors de la fibrillation des peptides amyloïdes, les monomères s'auto-assemblent formant dans un premier temps des espèces intermédiaires oligomériques puis des fibrilles et des fibres. Il est maintenant admis que dans le processus d'auto-assemblage, ni les fibres, ni les monomères ne sont toxiques, mais que la toxicité est corrélée à la présence des espèces oligomériques [1] [86] [87]. En effet, des études ont montré que lorsque les peptides sont ajoutés à des cultures cellulaires, les espèces monomères ou les fibres n'affectent pas la viabilité cellulaire mais que les oligomères entraînent sa diminution [2] [3].

Différentes structures d'espèces intermédiaires amyloïdes ont été répertoriées : les espèces oligomériques à bas poids moléculaire (dimères, trimères, tétramères...) généralement appelées oligomères préfibrillaires, suivi par les protofibrilles qui peuvent être annulaires ou linéaires formant les fibres matures insolubles caractérisées par une structure en feuillets- $\beta$  [88](fig 1.15). Des intermédiaires d'agrégation ont pu être observés par différentes méthodes (AFM, EM) montrant des agrégats sphériques solubles de tailles comprises entre 3 et 10nm [62] [89] [90] [91] [92].

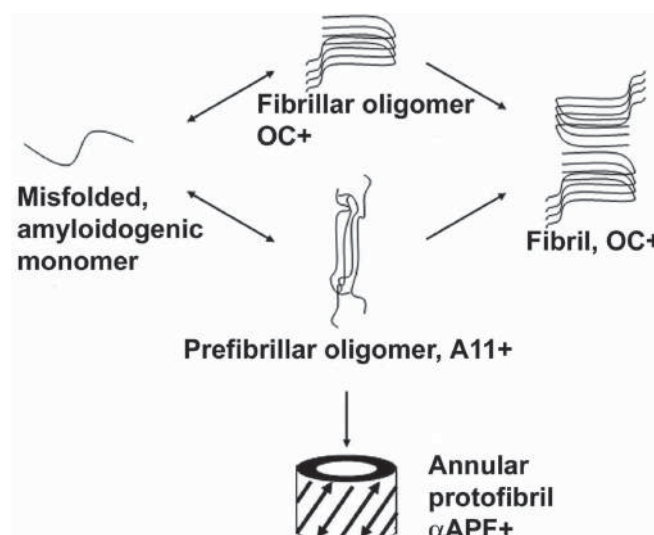


FIGURE 1.15 – Schéma représentant les différents états d'assemblage des oligomères dans le processus de fibrillation des amyloïdes. Adapté de Glabe [93].

### 1.4.1 Caractérisation de la structure secondaire d'A $\beta$ : feuillets- $\beta$ parallèles versus anti-parallèles

Comme dans le cas des fibres amyloïdes, les oligomères amyloïdes partagent une structure commune, différente de celle des fibres, supportée par la découverte d'anticorps anti-A $\beta$  protofibrilles capables de reconnaître les espèces protofibrillaires d'autres protéines amyloïdes toxiques [88] [2]. Ceci indique que les anticorps reconnaissent la structure générale des polypeptides indépendamment de la séquence d'acide-aminés. L'anticorps anti-oligomère a aussi montré *in vitro* qu'il pouvait inhiber la toxicité des oligomères solubles sans aucun effet sur les plaques séniles [93] [94].

Ces dernières années, de nombreuses études ont établi un lien entre la structure adoptée par les peptides d'A $\beta$  et la toxicité qu'ils génèrent. Elles montrent que les espèces intermédiaires, jouant un rôle dans la toxicité, adoptent toutes une structure secondaire en feuillets- $\beta$  anti-parallèles [4] [95] [96] [93] [97] [98] [99]. Ces études ont été effectuées sur différents modèles d'intermédiaires, tels que des oligomères [2] [9] [100], des "globulomères" (oligomères globulaires) [101] ou des oligomères fibrillaires appelés "TABFO" (*Toxic A $\beta$  Fibrillar Oligomer*) [3]. Plus que la taille de l'espèce c'est leur structuration commune en feuillets- $\beta$  anti-parallèles qui caractérise la forme dite toxique. Le tableau (1.5) répertorie plusieurs études menées sur des peptides amyloïdes montrant une structuration des espèces intermédiaires en feuillets- $\beta$  antiparallèles.

En dépit de recherches intensives dans ce domaine, ces intermédiaires ne sont toujours pas totalement caractérisés probablement à cause d'un manque de méthodes adaptées pour leur analyse. Des divergences considérables dans les résultats rapportés proviennent de la source d'A $\beta$  et de son état d'agrégation [102]. Les peptides synthétiques sont le plus souvent utilisés pour les différentes études. La solubilisation et la monomérisation du produit lyophilisé est souvent matière à préoccupation. L'hétérogénéité des échantillons contribue au manque de reproductibilité des expériences.

Toxicity related to antiparallel amyloid structures.

Peptides or proteins	Antiparallel structures	Techniques	Toxicity
A $\beta_{(1-42)}$	Globulomers (pH 7.4)	ATR-FTIR	On neurons (mitochondria)
		Liquid NMR	On rat hippocampal neurons (LTP)
A $\beta_{(1-42)}$	Oligomers (pH 7.4)	ATR-FTIR	On SH-SY5Y cells (MTT), in neurons
A $\beta_{(1-42)}$	TABFOs (pH 7.4)	FTIR, XRD	On PC-12, HeLa cells (MTT)
A $\beta_{(1-40)}$	Oligomers (pH 7.4)	ATR-FTIR	On SH-SY5Y cells (MTT)
D23N-A $\beta_{(1-40)}$ (Iowa mutant)	Fibers (pH 7.4)	ssNMR	On hippocampal neurons
E22V-A $\beta_{(12-28)}$	Short fibers (pH 7.25)	FTIR	On SH-SY5Y cells (MTT)
$\alpha$ -Synuclein	Oligomers (pH 7.4)	ATR-FTIR	On SH-SY5Y cells (MTT)
HET-S <sub>(218-289)</sub> mutant 8 (M8)	Fibers/oligomers (pH 7.4)	ATR-FTIR	In <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
HET-S <sub>(218-289)</sub> (13 mutants)	Fibers (pH 7.4)	ATR-FTIR	In <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
PrP <sub>(82-146)</sub>	Oligomers (HFIP/D <sub>2</sub> O)	FTIR	On murine cortical neurons
Lysozyme	Oligomers (pH 3.0)	ATR-FTIR	On SH-SY5Y cells (MTT)
	Fibers (pH 7.5)	ATR-FTIR	On SH-SY5Y cells (MTT)
$\alpha$ B-crystallin (segment K11V-TR)	Oligomers (pH 6.5) called "cylindrins"	XRD	On SH-SY5Y, PC-12, HeLa and HEK293 cells (MTT)

TABLE 1.5 – Toxicité liée à la structure antiparallèle des amyloïdes extrait de [8].

La découverte des intermédiaires toxiques formés lors de l'auto-assemblage des peptides amyloïdes et de leur structuration différente en fibres matures pose la question du chemin d'auto-assemblage.

### 1.4.2 Formation des oligomères toxiques : "*on-pathway versus off-pathway*"

Les études sur l'auto-assemblage du peptide A $\beta$  ont permis d'avancer deux hypothèses sur la formation des espèces intermédiaires dites toxiques qui adoptent une structure en feuillets- $\beta$  anti-parallèles : un cheminement unique ou deux voies d'agrégation distinctes.

Les intermédiaires de repliement étaient à l'origine décrits comme des états aberrants du paysage énergétique représentant des pièges cinétiques. Les intermédiaires partiellement repliés sont désormais connus pour jouer un rôle clé dans la formation des fibres pour de nombreuses protéines amyloïdogéniques (A $\beta$ ,  $\alpha$ -synucleïne, hungtitine) [64] [103] [40]. La formation de ces intermédiaires serait due à une réorganisation des contacts inter-résidues, dans les interactions natives et non-natives, impliquant des hautes barrières d'énergie. Ces espèces peuvent avoir un rôle dans le repliement natif de la protéine ("*on-pathway*") ou être piégées de telle sorte que la structure native ne puisse être atteinte sans réorganisation substantielle ("*off-pathway*") [52].

En 2013, Sarroukh *et al* proposent que les espèces oligomériques avec une organisation en feuillets- $\beta$  antiparallèles se formeraient dans le cheminement classique d'A $\beta_{40}$  et A $\beta_{42}$  menant à la formation de fibres structurées en feuillets- $\beta$  parallèles "*on-pathway*" (fig 1.16). Leur étude montre que les fibres d'A $\beta$  obtenues après 1 semaine et 36 jours adoptent une structure en feuillets- $\beta$  parallèles alors que des oligomères obtenus entre 1h et 24h sont structurés en feuillets- $\beta$  antiparallèles. Ils expliquent que cette transition structurale d'oligomères à fibres est supportée par une réorganisation des feuillets- $\beta$ . Des études suggèrent que la conversion de feuillets- $\beta$  anti-parallèles à parallèles est thermodynamiquement favorable et possible via une rotation à 90° des brins- $\beta$  impliqués [4] [9] [104].



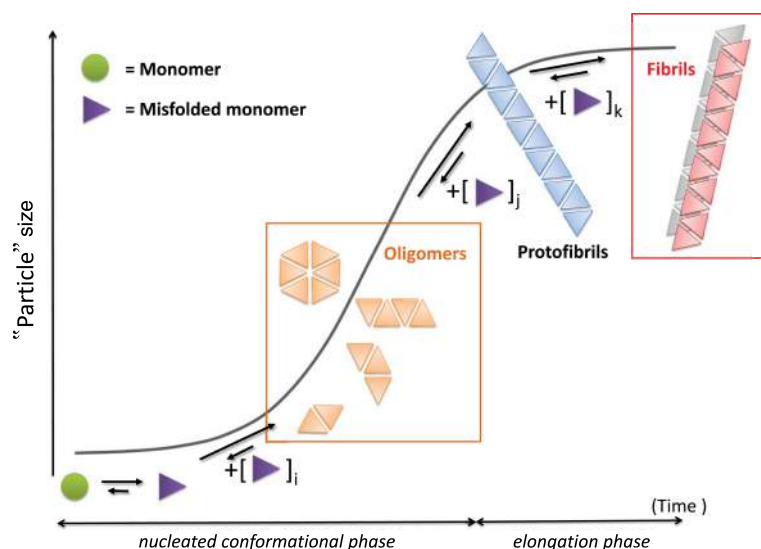


FIGURE 1.16 – Représentation schématique du processus d'agrégation des peptides amyloïdes proposée par Sarroukh *et al* [4].

D'autres études rapportent qu'il existe une voie d'agrégation alternative induisant la formation des oligomères neurotoxiques "*off-pathway*" [52] [105] [85] [59]. Ces études ont montré qu'il existe de nombreuses voies d'agrégation en compétition avec la formation de fibres ce qui mène à la formation de plusieurs sortes d'oligomères. Une des propriétés des oligomères *off-pathway* est que lorsqu'ils s'auto-assemblent pour former des fibres, le processus est beaucoup plus lent que la formation de fibres "*on-pathway*" et ils possèdent un temps de demi-vie plus long. Cette caractéristique résulte en une toxicité prolongée sur les cellules neuronales et donc des conséquences sur la pathologie de la maladie d'Alzheimer. Kumar *et al* ont formé des oligomères *in vitro* (appelé LFAO *Large Fatty Acid-derived Oligomer* et SFAO *Small Fatty Acide-derived Oligomers*), caractérisés par une structure en feuillets- $\beta$ , qui ne forment pas fibres [59](fig 1.17).

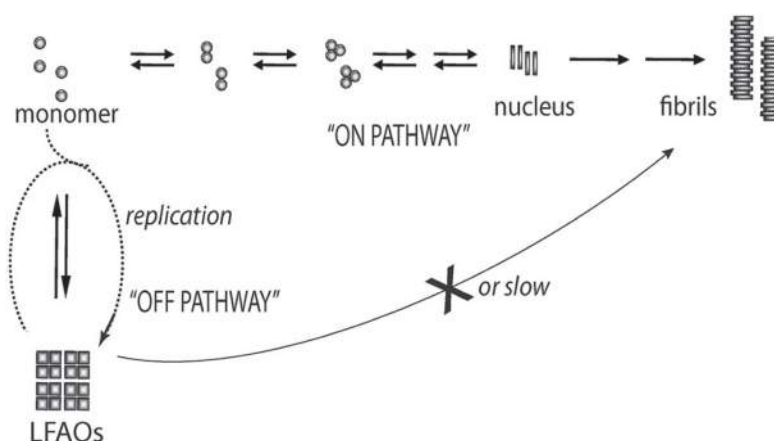


FIGURE 1.17 – Schéma décrivant la génération d'oligomères *off-pathway* et les mécanismes de réplication de ces espèces. D'après Kumar *et al* [59].

Des résultats similaires ont été obtenus par Vignaud *et al* [5]. Leur étude d'A $\beta_{1-42}$  a montré que contrairement aux monomères qui possèdent un chemin d'agrégation commun aboutissant à la formation de fibres matures structurées en feuillets- $\beta$  parallèles, un oligomère d'un mutant



ponctuel d'A $\beta_{1-42}$  s'auto-assemble selon un cheminement distinct formant des feuillets- $\beta$  anti-parallèles (fig 1.18). Cet oligomère est plus toxique que les monomères sur des cellules en culture. L'ensemble de ces résultats met en évidence une nouvelle voie d'assemblage en feuillets- $\beta$  anti-parallèles de l'oligomère toxique stable d'A $\beta_{1-42}$ .

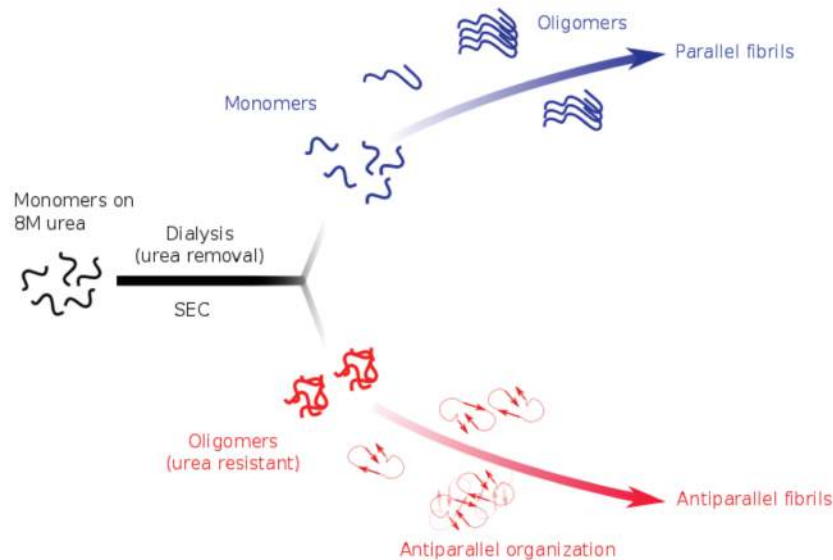


FIGURE 1.18 – Modèle des voies de fibrillation *on* et *off-pathway* avancé par Vignaud *et al* [5].

### 1.4.3 Un modèle de toxicité d'A $\beta$

#### 1.4.3.1 A $\beta$ et ses mutants

Certains cas familiaux de la maladie d'Alzheimer sont dus à des mutations ponctuelles de la séquence d'A $\beta_{1-42}$ . Ils présentent une toxicité accrue et un développement plus rapide de la maladie. Les mutants les plus étudiés : Dutch (E22Q), Flemish (A21G), Italian (E22K), Arctic (E22G) et Iowa (D23N), caractérisés *in vivo* et *in vitro*, montrent une grande diversité de production d'A $\beta$ , de symptômes induits, de dépôts amyloïdes et notamment de cinétiques de formation des fibres. De même, les espèces responsables de la toxicité varient d'un mutant à l'autre, par exemple, dans le cas des mutants Arctics il a été montré que ce sont les espèces non-fibrillaires qui induisent le déclin cognitif alors que la gravité des symptômes de perte de mémoire, dans le cas du mutant Dutch, est corrélée aux espèces fibrillaires matures [106] [107] [108].

#### 1.4.3.2 Mutants d'A $\beta_{1-42}$ de toxicités variables

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est utilisée depuis de nombreuses années pour l'étude des processus à l'origine des maladies neurodégénératives et plus particulièrement pour l'étude de la maturation de la protéine APP et des propriétés du peptide A $\beta$  (agrégation, toxicité) impliqués dans la maladie d'Alzheimer [109] [110].

Les expériences menées sur différents mutants familiaux de la maladie d'Alzheimer ont mis en lumière des différences de toxicité dans la levure, selon les mutants observés, lors de tests



Certains mutants ne présentent qu'une unique mutation. La plupart des mutations uniques sont localisées entre les résidus 18 et 42. Cette mutagenèse a permis d'établir que certains résidus sont strictement requis pour la toxicité d'A $\beta_{1-42}$  ; il s'agit de l'isoleucine en position 31 (Ile31) de la séquence et de la leucine en position 34 dans la séquence (Leu34). En effet, la quarantaine de mutants toxiques identifiée présente des mutations sur l'ensemble de la séquence et aucune mutation n'a été observée sur ces résidus. L'hypothèse a pu être vérifiée lorsque ces deux acides aminés ont été modifiés entraînant une perte de la toxicité.

Parmi ces mutants, on retrouve le mutant Arctic E22G impliqué dans un cas familial de la maladie d'Alzheimer et une série de mutants plus toxiques dans le modèle de levure que le A $\beta_{1-42}$  *wild type* (WT). Pour nos études, nous nous sommes concentrés sur trois peptides : A $\beta_{1-42}$ -WT, un peptide moins toxique que le WT, le mutant L34T (leucine remplacée par une thréonine en position 34 dans la séquence), et le mutant G37C (glycine située en position 37 remplacée par une cystéine) plus toxique que WT (fig 1.21).

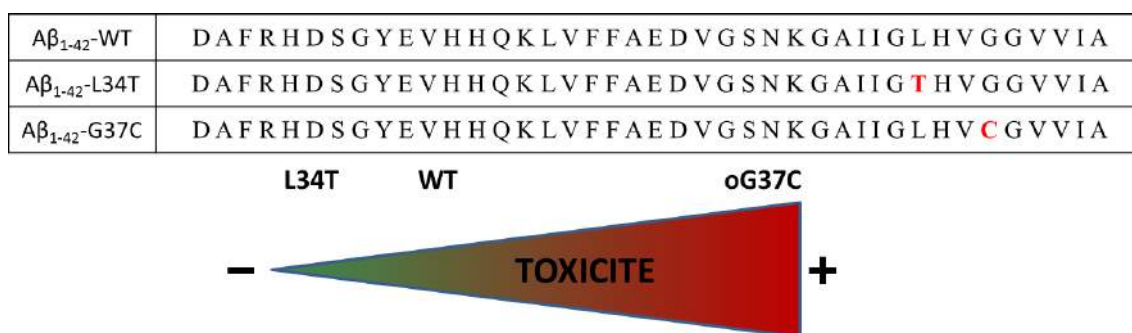


FIGURE 1.21 – Séquences des peptides A $\beta_{1-42}$  utilisés pour les études biophysiques rapportées dans ce manuscrit. Classement par ordre croissant de toxicité.

## 1.5 Cible des amyloïdes : la membrane

Il est désormais acquis que la toxicité du peptide A $\beta$  est liée à sa capacité à interagir avec les membranes neuronales.

### 1.5.1 Des membranes biologiques aux membranes artificielles

Les membranes plasmiques définissent la barrière entre le milieu extracellulaire et le milieu intracellulaire, elles garantissent l'individualité cellulaire et la compartimentation permettant le maintien de compositions différentes entre le cytosol et le milieu externe ou entre le cytosol et la lumière des organites tout en assurant une perméabilité sélective. Elle permet ainsi des échanges contrôlés entre l'intérieur de la cellule et le milieu extra-cellulaire favorisant la traversée de certaines substances (ions, peptides, protéines), retenant certains composés à l'intérieur de la cellule et en empêchant d'autres d'entrer. La flexibilité des membranes plasmiques leur permet de se rompre et de se refermer conditionnant les processus de trafics vésiculaires et de divisions cellulaires.

La description de la membrane est inspirée du modèle de la mosaïque fluide proposée par Singer et Nicolson dans les années 70 [112] [113]. La membrane plasmique est désormais considérée comme étant une mosaïque structurée et dynamique [114](fig 1.22).

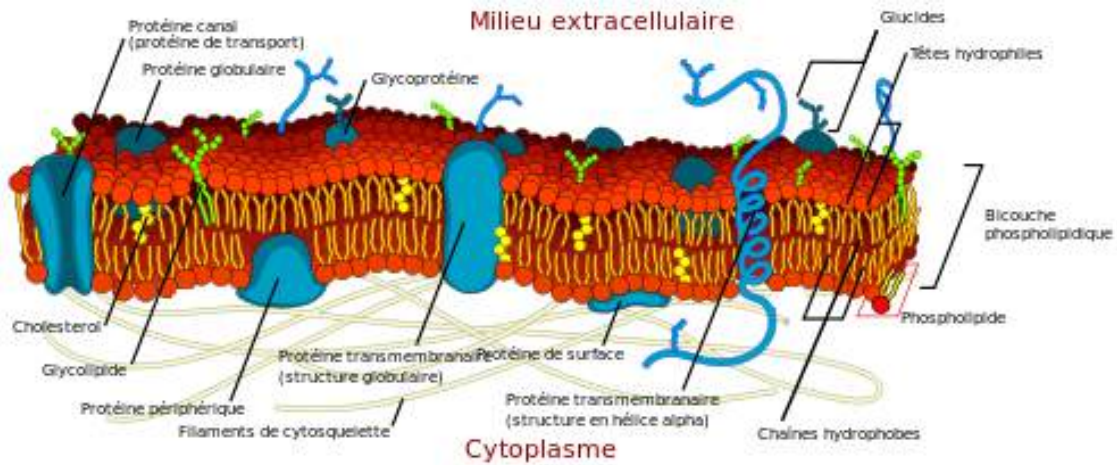


FIGURE 1.22 – Représentation du modèle de la mosaïque fluide.

### 1.5.1.1 Composition chimique des membranes biologiques

Les membranes sont essentiellement composées de lipides, de protéines et de composés osidiques dont les quantités relatives varient d'une cellule à l'autre et d'une membrane à l'autre.

Les protéines membranaires représentent le deuxième constituant essentiel de la membrane cellulaire. Les membranes contiennent entre 20 et 80 % de protéines. Les protéines sont considérées comme étant les composés biochimiques actifs de la membrane procurant une diversité d'enzymes, de transporteurs, de récepteurs, de canaux (etc) qui différencient chaque membrane en particulier.

Le troisième composant entrant en jeu dans la composition des membranes sont les sucres membranaires, les glucides. Ils forment une enveloppe, le glycocalyx [115] sur le côté externe de la membrane jouant un rôle protecteur sur les protéines membranaires contre la protéolyse, sur la stabilité des protéines et sur l'adhésion intercellulaire.

Les constituants majoritaires des membranes sont les lipides. Il existe une grande variété de lipides possédant des caractéristiques différentes : structure, géométrie et propriétés physiques dont la composition varie selon le type de membrane cellulaire. Tous les lipides composant la membrane cellulaire sont amphiphiles possédant des groupements aliphatiques ou aromatiques (tel que le cholestérol) et des groupements polaires variés. Il existe trois familles de lipides dans les membranes : les glycérophospholipides (plus communément appelés phospholipides), les sphingolipides et les stérols. C'est la nature de la molécule centrale servant à la liaison des groupements polaires aux chaînes apolaires et la nature des chaînes carbonées qui permettent la classification des lipides dans l'une ou l'autre des familles.

Parmi les tissus présents dans le corps, le tissu neuronal est l'un des plus riches en lipides. Le cerveau contient la plus grande diversité de lipides. Les lipides représentent entre 10 et 20 % de

la masse fraîche et la moitié de la matière sèche du cerveau [116]. Les différentes fonctions exercées par le cerveau humain sont dépendantes de l'organisation complexe de groupes neuronaux composés en une diversité de cellules neurales avec des profils lipidiques particuliers [117].

Le cerveau est majoritairement composé de cholestérol, phospholipides et sphingolipides.

**Les glycérophospholipides** Les phospholipides sont les lipides les plus répandus dans les membranes biologiques. Dans cette famille, c'est un alcool ; le glycérol qui joue le rôle de molécule centrale faisant le lien entre la tête polaire et les queues hydrophobes formant le lipide (fig 1.23). Deux des trois fonctions alcool du glycérol sont estérifiées par des acides gras (partie hydrophobe). La longueur des chaînes carbonées peut varier, généralement supérieure à 16 carbones, ainsi que le présence d'insaturation ou non ce qui confère à la membrane sa fluidité. Les chaînes saturées fluidifient les membranes alors que les chaînes présentant des insaturations la rigidifient.

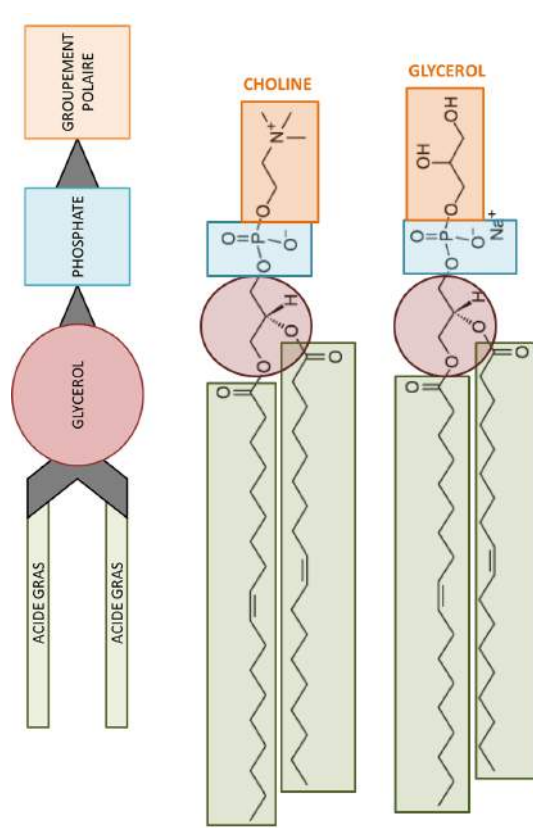


FIGURE 1.23 – Structure des glycérophospholipides (gauche), exemple du DOPC (milieu) et du DOPG(droite).

Le troisième alcool est substitué par une liaison phosphodiester portant le groupement qui va déterminer la classe du glycérolipide : s'il s'agit d'un éther de galactoside le lipide est un glycéroglycolipide, s'il s'agit d'un acide phosphorique alors le lipide est un glycérophospholipide. L'acide phosphorique peut être lui-même estérifié par différents groupements polaires (table 1.6) qui vont faire varier les propriétés physico-chimiques du phospholipide.

Groupelement polaire	Nom du lipide	Abréviation	Charge
-H	acide phosphatidique	PA	négative
-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	phosphatidylcholine	PC	zwitterionique
-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	phosphatidyléthanolamine	PE	zwitterionique
-CH <sub>2</sub> CHNH <sub>3</sub> <sup>+</sup> COO <sup>-</sup>	phosphatidylsérine	PS	négative
-CH <sub>2</sub> CHOHCH <sub>2</sub> OH	phosphatidylglycérol	PG	négative
-HC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> (OH) <sub>5</sub>	phosphatidylinositol	PI	négative
-CH <sub>2</sub> CHOHCH <sub>2</sub> <sup>-</sup>	cardiolipine	CL	négative

TABLE 1.6 – Principaux groupements polaires et glycérophospholipides présents dans la membrane.

**Les sphingolipides** Les sphingolipides sont dérivés de céramides, formés d'une sphingosine et d'un acide gras liés par une liaison amide. Dans cette classe de lipides, c'est la céramide qui fait office de molécule liant la tête polaire et le squelette carboné (fig 1.24). Si le groupement polaire est un hydrogène, le sphingolipide obtenu est alors un céramide ou une sphingosine. Si le groupement polaire est un phospholipide, on obtient un sphingophospholipide. Par exemple lorsque le groupement polaire est la phosphocholine on obtient la sphingomyéline qui est le sphingophospholipide le plus couramment trouvé dans les membranes biologiques. Les sphingolipides formés avec des groupements glycanes sont des sphingoglycolipides.

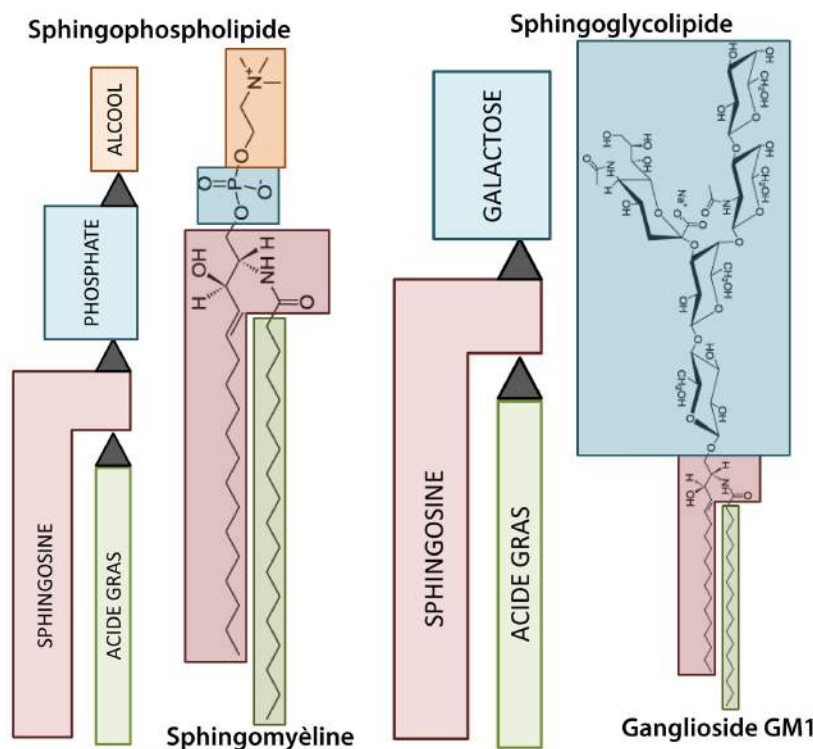


FIGURE 1.24 – Structure des sphingolipides : les sphingophospholipides (à gauche) et exemple de la sphingomyéline (milieu gauche), les sphingoglycolipides (milieu droite) et exemple du ganglioside GM1 (à droite).

Parmi les sphingoglycolipides on trouve les gangliosides qui sont des sphingoglycolipides acides dont les chaînes oligosaccharidiques sont terminées par des résidus d'acide sialique. Les gangliosides sont répertoriés en fonction de leur nombre d'acide sialique et résidus d'oses. Par exemple dans le cas du ganglioside GM1 : G signifie ganglioside, M indique qu'il ne possède qu'un seul acide sialique (M=1, D=2, T=3, Q=4) et le chiffre 1 qu'il possède 4 résidus d'oses ; il peut prendre les valeurs 3, 2 ou 1 selon s'il y a 2, 3 ou 4 résidus d'oses. GM1 est donc un monoacide sialique comportant 4 résidus d'oses en plus de l'acide sialique.

**Les Stérols** Les stérols sont des molécules composées d'un noyau de stérane auquel est lié un groupement hydroxyle, formant la partie polaire du lipide (fig 1.25). Le noyau de stérane est constitué de 3 groupements aromatiques à 6 carbones et un cycle à 5 carbones ce qui confère aux stérols une structure plane et rigide. Les stérols n'ont pas la capacité à former seuls des bicouches mais peuvent s'insérer dans la membrane suivant l'orientation des phospholipides présents. Les stérols sont considérés comme une sous-classe des stéroïdes.

Le cholestérol est l'un des stérols les plus communs et répandus, il représente environ 30% en masse des lipides membranaires [118]. En s'intercalant au sein de la membrane, le cholestérol contribue à sa stabilité et au maintien de son organisation structurale, il maintient l'homogénéité de la membrane. Le cholestérol affecte la fluidité de la membrane, tout particulièrement dans les microdomaines lipidiques de la membrane plasmique les rendant hautement compacts. L'impact du cholestérol sur la membrane dépend de son état initial : lorsque celle-ci est en phase gel, le cholestérol augmente sa fluidité alors que si la membrane est dans une phase de solide cristallin le cholestérol aura tendance à augmenter l'organisation des lipides et donc d'en diminuer la fluidité.

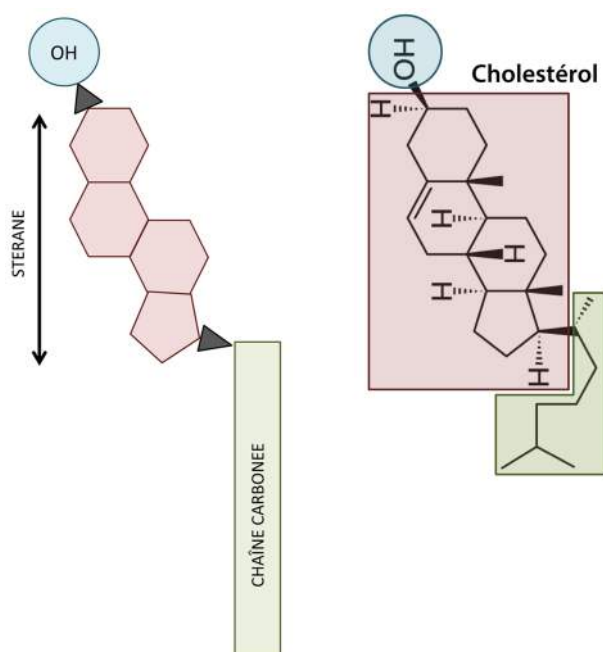


FIGURE 1.25 – Structure des stérols (à gauche), exemple du cholestérol (à droite).

Même si l'origine de l'hétérogénéité et de la distribution des lipides dans les membranes n'est pas connue, les lipides sont reconnus pour jouer des rôles multiples au sein des membranes [118] :

- les lipides forment une bicouche stable dans laquelle les protéines peuvent exercer leurs



fonctions

- certains lipides sont requis pour stabiliser des régions de la membrane avec un haut rayon de courbure et les jonctions entre les membranes et optimiser les interactions avec des protéines spécifiques en rigidifiant la membrane.
- agents régulateurs
- utilisés dans les processus de biosynthèse
- optimisation de l'activité enzymatique
- les gangliosides en particulier, jouent un rôle dans la régulation de la croissance cellulaire et sont impliqués dans la liaison avec des récepteurs spécifiques dans la membrane plasmique et dans le processus d'adhésion.

### 1.5.2 Modèle d'interaction protéine amyloïde-membrane

La nature amphipathique de la plupart des amyloïdes pourrait contribuer à leurs capacités : d'insertion dans les membranes, de recouvrement de la surface des membranes et potentiellement d'action similaire aux peptides antimicrobiens (fig 1.26). En particulier, il est maintenant admis que ce sont les espèces oligomériques qui interagissent avec les membranes. Les mécanismes d'interaction proposés sont les suivants [12] :

- par recouvrement de la membrane : effet "tapis"
- par dissolution de la membrane : effet détergent
- par perméation de la membrane : formation de pores

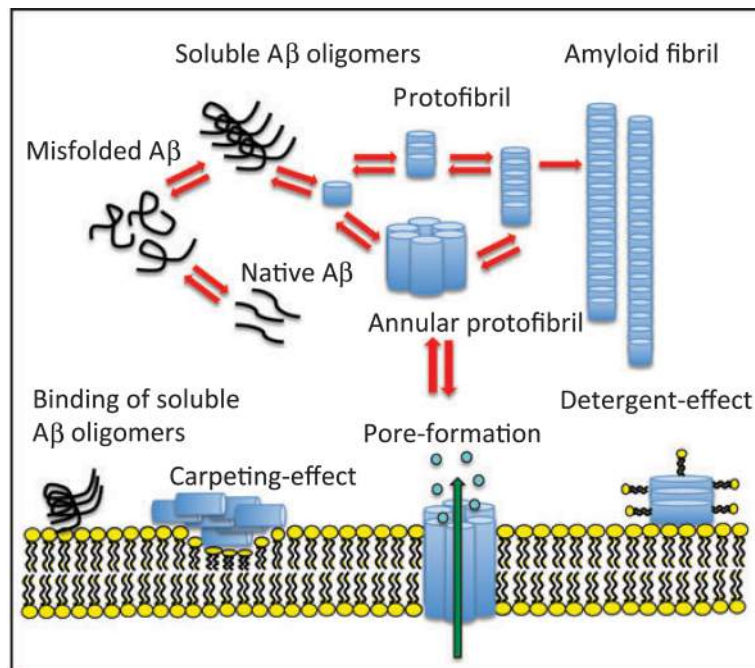


FIGURE 1.26 – Schéma décrivant les trois mécanismes possibles d'interaction d' $A\beta$  avec des membranes : l'effet tapis ("carpeting effect"), la formation de pores ("pore formation") et l'effet détergent ("detergent effect"), d'après Butterfield et Lashuel [13].



Le recouvrement de la surface (effet "*carpet*") de la membrane par les protéines induirait une augmentation de la pression et donc une asymétrie entre les deux feuillets membranaires et la fuite de petites molécules [119]. De plus, l'interaction des peptides avec les membranes favoriserait la formation d'espèces toxiques [120].

Le deuxième modèle proposé est basé sur l'effet détergent des peptides amyloïdes sur les lipides membranaires [13]. Le peptide interagit avec la partie hydrophobe de la membrane et s'entoure de lipides pour former des micelles. La protéine, une fois attachée, s'oriente pour que ses résidus hydrophobes soient au contact de la partie hydrophobe de la membrane ce qui entraîne la destruction de la membrane. Un trou est alors formé dans la membrane par arrachement de lipides à la bicouche.

Enfin, le modèle le plus généralement décrit et caractérisé est la perméabilisation de la membrane suite à la formation de pores par les espèces oligomériques [15] [8] [121] [13]. Arispe *et al* proposent en 1992, que l'origine de la toxicité d'A $\beta$  est basée sur un mécanisme de formation de canaux ioniques quand ils découvrent qu'A $\beta$  est capable de former des canaux ioniques dans des bicouches [122]. La formation de ces pores entraînerait une dépolarisation de la membrane, la fuite d'ions Ca<sup>2+</sup> et ainsi la perturbation de l'homéostasie ionique. L'augmentation intracellulaire du calcium en découlant pourrait initier un processus pathogénique incluant la production de dérivés réactifs à l'oxygène (radicaux libres, ions oxygénés, peroxydes), l'altération des circuits de signalisation et une dysfonction mitochondriale [13] [93]. Le phénomène de formation de pores ou de canaux ioniques a été observé pour de nombreux peptides amyloïdes : l' $\alpha$ -synucléine [123], hIAPP [124], A $\beta_{1-42}$  [125]...

Sans exclure les différents mécanismes cités précédemment, l'importance des domaines lipidiques présents dans les membranes seraient au premier plan dans l'interaction des oligomères amyloïdes avec les membranes entraînant une forte cytotoxicité [126]. L'interaction des peptides amyloïdes avec les membranes semble favorisée par les radeaux lipidiques ("*lipid rafts*") initiant les mécanismes de toxicité [127] [128] [129]. Les radeaux lipidiques participeraient à l'attachement des oligomères d'A $\beta$  à la membrane déclenchant la pathologie dans le cas de la maladie d'Alzheimer [130]. Plus particulièrement, des résultats récents mettent en évidence l'importance de la composition en cholestérol et ganglioside, notamment les GM1, des membranes neuronales [131] [132] [133] [134] [135] [12].

Dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer certaines zones présentent une teneur en cholestérol différente des mêmes zones dans le cas de cerveaux de personnes non démentes. Dans le cas de la maladie, le ratio de cholestérol par rapport aux phospholipides peut être diminué jusqu'à 30% ce qui a une grande influence sur la fluidité de la membrane neuronale et ainsi la rend plus susceptible à la perméation par les peptides A $\beta$  [136]. La diminution de la teneur en cholestérol de la membrane a aussi un impact sur le clivage de l'APP induisant une surproduction d'A $\beta$  [137]. Les changements de la teneur en cholestérol observés suite au vieillissement des cellules pourraient aussi diminuer les processus de dégradation d'A $\beta$  [138]. Certaines études ont montré que le cholestérol aurait aussi une influence sur la capacité d'A $\beta$  à s'insérer dans la membrane. Les membranes riches en cholestérol induiraient une diminution de l'auto-assemblage en faveur d'une augmentation de l'incorporation d'A $\beta_{1-40}$  dans les membranes

[138].

Parmi les différents lipides présents dans les membranes neuronales, c'est le ganglioside GM1 pour lequel  $A\beta_{1-42}$  possède la plus grande affinité [139]. L'équipe de Matsuzaki propose un mécanisme d'interaction d' $A\beta$  avec GM1 en présence de cholestérol et sphingomyéline. Le peptide changerait d'état conformationnel passant de random en solution à hélice- $\alpha$  puis feuillets- $\beta$  (observé en dichroïsme circulaire) [134] (fig 1.27).

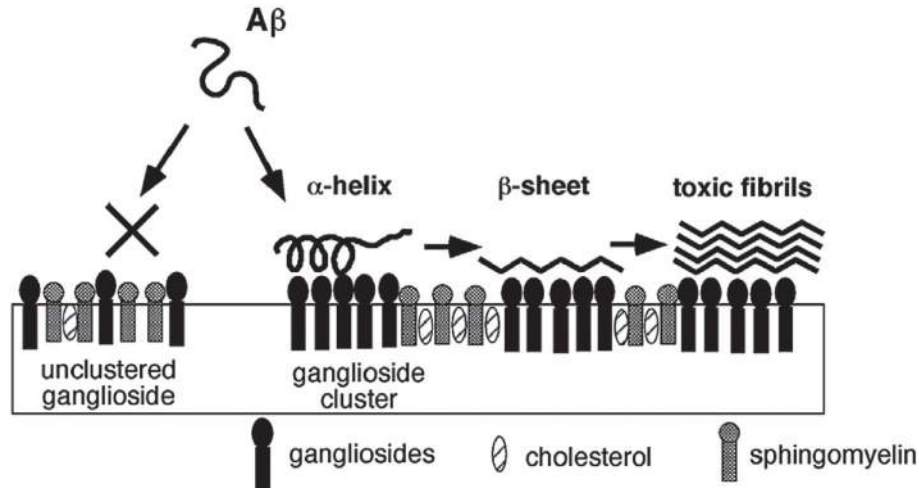


FIGURE 1.27 – Modèle d'interaction d' $A\beta$  avec des gangliosides. De sa forme monomérique soluble désordonnée jusqu'à la formation de fibres organisées en feuillets- $\beta$ . D'après Matsuzaki *et al* [134].

Néanmoins, le mécanisme induisant cette transformation structurale en présence de GM1 reste inconnu. Les GM1 auraient également un impact sur l'auto-assemblage d' $A\beta_{1-40}$  en augmentant la fibrillation et en diminuant le temps de latence par le biais d'interactions électrostatiques entre la charges positives d' $A\beta$  et la tête polaire des GM1 chargée négativement [140].

L'environnement lipide-protéine semble être un facteur physico-chimique jouant un rôle important sur la cinétique de formation des fibres et sur la cytotoxicité. Un nombre important d'études sur la fibrillation des amyloïdes en présence de systèmes membranaires modèles ont révélé une modification importante de la cinétique de formation des amyloïdes par les lipides. Ces modifications sont attribuées à des interactions lipide-protéine spécifiques et non-spécifiques contrôlées par de nombreux facteurs tels que la composition, la charge et l'organisation des lipides [141] [142] [143]. Les résultats obtenus lors d'études sur l'impact des membranes sur l'auto-assemblage des amyloïdes peuvent parfois être contradictoires. Certaines supportent l'idée que la présence de lipides diminue la barrière d'énergie d'activation du dépliement des protéines et qu'une modification de l'environnement protéine-lipide peut produire des cheminements d'association divergents ce qui produit des fibres matures avec différentes organisations [144]. D'autres études ont montré au contraire que les lipides augmentaient la fibrillation des amyloïdes en suivant leur changement de structure secondaire vers une organisation en feuillets- $\beta$  [142]. Les différents résultats obtenus montrent que le processus de fibrillation peut être modifié par la présence de lipides en fonction de leur charge [8]. On trouve que les lipides anioniques auraient tendance à accélérer la fibrillation d'amyloïde ( $\alpha$ -synucléine, Tau, IAPP,  $A\beta$ ) [145] [146] [147] [140] alors

que les lipides zwitterioniques pourraient ralentir la croissance des fibres [148].

Les mécanismes d'interaction des amyloïdes avec les membranes à l'échelle moléculaire ne sont toujours pas totalement élucidés. Nous pouvons noter l'importance des études biophysiques, par le biais de modèles membranaires variés, pour leur compréhension.

### 1.5.3 Membranes modèles

La connaissance de la structure, l'organisation et la composition de la membrane biologique a permis de développer plusieurs modèles, utilisés notamment dans le domaine de la biophysique, afin de simplifier et de rendre compréhensible des phénomènes membranaires complexes.

La structuration des lipides dépend de plusieurs paramètres dont la température, la concentration et leurs géométries entraînant une organisation en différentes structures (sphères, monocouches...).

Plusieurs modèles ont été développés et sont couramment utilisés de nos jours. Parmi ces modèles on trouve, du plus simple au plus complexe : les monocouches, les micelles et bicelles, les vésicules multi-lamellaires *MLV*, les liposomes (petites vésicules unilamellaires *SUV*, larges vésicules unilamellaires *LUV*, vésicules unilamellaires géantes *GUV*), les bicouches lipidiques planes (films noirs *Black Lipid Membrane BLM*, bicouches supportées). Ne sont détaillés par la suite que les modèles utilisés pour les études rapportées dans ce manuscrit.

#### 1.5.3.1 Monocouches de Langmuir

Les monocouches ont été décrites dès 1917 par Langmuir [149] après l'observation de films d'huile à l'interface air-eau. Les films formés sont constitués d'une monocouche de lipide occupant toute la surface disponible formant une couche simple d'atomes ou de molécules étroitement rassemblés. Les têtes polaires des lipides sont orientées vers la phase aqueuse et les queues hydrophobes vers l'air.

La technique de la cuve de Langmuir est très utilisée pour étudier l'insertion de molécules dans les monocouches par un suivi de la pression de surface avec un tensiomètre (fig 1.28).

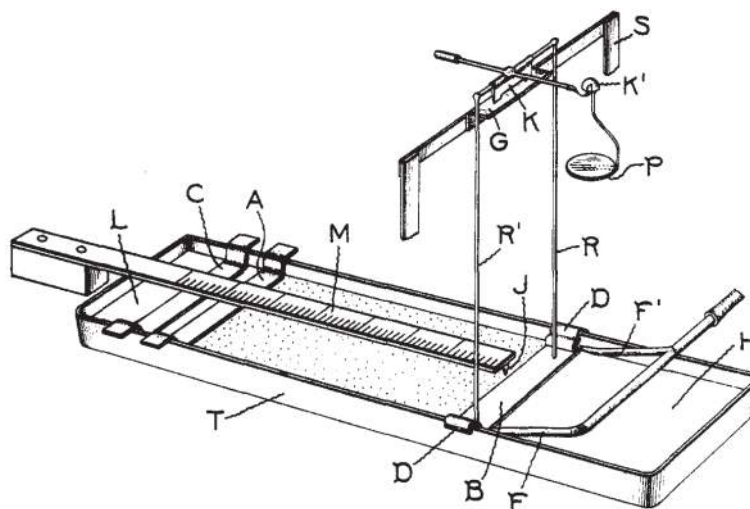


FIGURE 1.28 – Schéma de la cuve de Langmuir, d'après Langmuir [149].

### 1.5.3.2 Les liposomes

Les vésicules ou liposomes sont les modèles membranaires les plus utilisés car ils représentent un modèle simple de membrane.

Bangham et Horne sont les premiers à observer, par microscopie électronique, la structuration de lipides (la lécithine) en sphérules constituées en "lamelles concentriques" [150](fig 1.29). Les sphérules phospholipidiques observées ne seront appelées liposomes qu'en 1968 par Sessa et Weissmann [151].

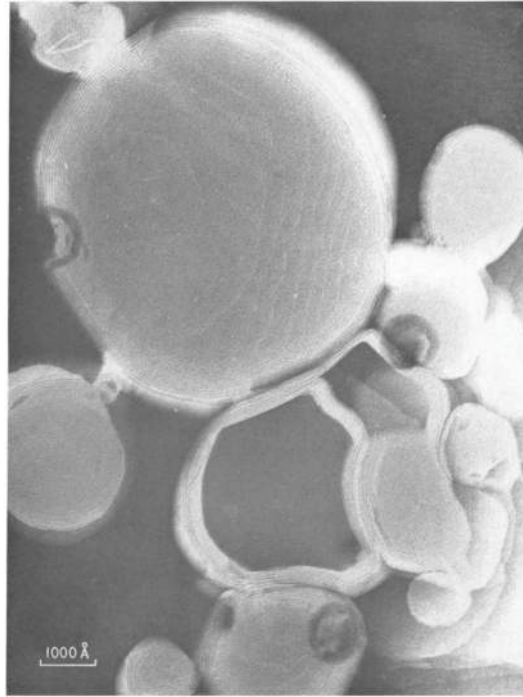


FIGURE 1.29 – Images de microscopie électronique de sphérules formées par la lécithine, observées par Bangham et Horne en 1964.

Il existe des tailles et des formes variables de liposomes dont les diamètres sont compris entre quelques dizaines de nanomètres et quelques microns. Les vésicules peuvent être constituées d'une bicouche lipidique (SUV, LUV, GUV) ou de plusieurs (MLV)(fig 1.30). Les SUV ont un diamètre compris entre 25 et 50 nm et donc un grand rayon de courbure ce qui leur confère une forte instabilité et une tendance à la fusion qui permettent la formation des bicouches supportées. Les LUV ont un diamètre compris entre 100 et 500 nm [152] et sont assez stables dans le temps. Il est possible d'obtenir des LUV asymétriques avec une composition du feuillet interne du liposome différente de celle du feuillet externe [153]. La structuration en liposomes représente l'organisation des lipides la plus stable en milieu aqueux permettant de minimiser les interactions entre les parties hydrophobes des lipides et les molécules d'eau.

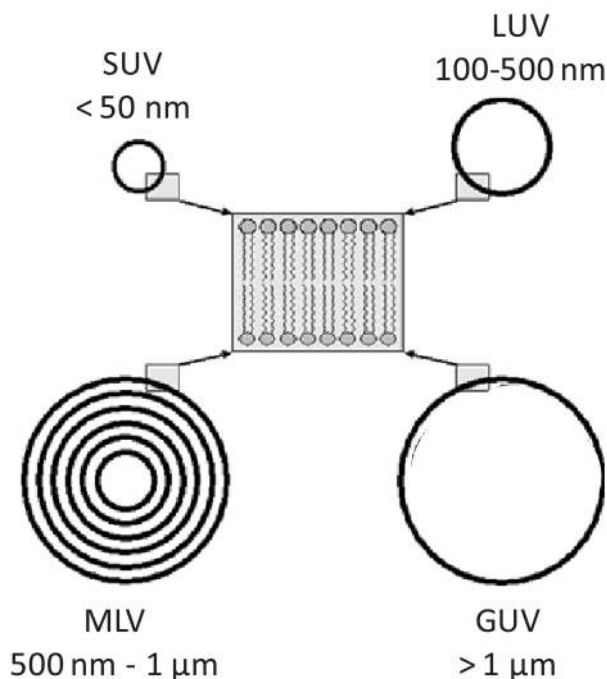


FIGURE 1.30 – Différents modèles de liposomes et leurs diamètres extrait de [154].

### 1.5.3.3 Bicouches supportées

Contrairement aux membranes cellulaires ou aux liposomes dans lesquelles la bicouche lipidique est enroulée de sorte à former une coque fermée, la bicouche lipidique supportée est une structure plane déposée sur un support solide. Seul un des deux feuillets de la bicouche est exposé vers le milieu aqueux, l'autre feuillet se retrouvant face au support.

Les bicouches supportées peuvent être facilement formées par éclatement spontané de petites vésicules unilamellaires (*SUV*) sur la surface.

Ces modèles permettent une grande liberté expérimentale mais il est important de noter que certains modèles membranaires sont limités par la composition lipidique. Il est notamment impossible de former des SUVs stables constituées uniquement de DOPG à cause du grand rayon de courbure induit par les chaînes latérales du lipide et l'encombrement stérique des têtes de PG. Pour la formation de SUV, seule une teneur maximale de 30% en PG est envisageable.

## 1.5.4 Interaction d' $A\beta_{1-40}$ et $A\beta_{1-42}$ avec des modèles membranaires

De nombreuses études rapportant l'effet d' $A\beta$  sur des membranes modèles ont été publiées. Une grande partie d'entre elles a été effectuée avec des modèles membranaires constitués seulement de phospholipides de charges variables (PC, PG, PE...). D'autres modèles plus complexes ont aussi été utilisés, incluant des gangliosides GM1, du cholestérol et de la sphingomyéline... Le tableau 1.7 répertorie les différents résultats obtenus.

<b>A<math>\beta_{40}</math> ou A<math>\beta_{42}</math></b>	<b>Lipides</b>	<b>Modèle membra- naire</b>	<b>Techniques</b>	<b>Résultats principaux</b>
A $\beta_{40}$	DDPE, DMPE	Monocouche	IRRAS, GIXD	interaction dépendante de la pression de surface, interaction à faible pression de surface + organisation en feuillets- $\beta$ [155]
A $\beta_{40}$	POPG, POPC/POPG	Monocouche	tensiométrie	interaction avec lipides anioniques à faible pression de surface (20mn/m) [156]
A $\beta_{40}$	PC	LUV	Rouge Congo, spectroscopie UV	interaction d'A $\beta$ avec PC, PC diminue l'auto-assemblage d'A $\beta$ [148]
A $\beta_{40}$	DPC	Micelles	RMN, CD	rôle de l'organisation des lipides sur la structure d'A $\beta$ : structuration en hélice- $\alpha$ en présence de micelle très organisées et en feuillets- $\beta$ en présence de micelle moins organisées [157]
A $\beta_{42}$	DOPC, DPPC	Bicouche	AFM, fluores- cence	accumulation d'A $\beta$ sur les domaines DPPC [158]
A $\beta_{42}$	DPPC, DOPG, DOTAP, DOPC	Bicouche	AFM	interaction d'A $\beta$ avec DPPC en phase gel et DOPG en phase fluide [159]
A $\beta_{40}$	DPPC/PG, DPPC/PS, POPC, POPC/PG	LUV	FRET, ThT, CD, fluo- rescence, Calorimétrie	interaction avec membranes anioniques [160] [161]
A $\beta_{42}$ et A $\beta_{40}$	PC, PE, PG, PS	LUV	CD, turbidité, fluorescence	stabilisation de la structure $\beta$ par lipides anioniques, interaction électrostatique avec têtes polaires des lipides [162]

$A\beta_{42}$	POPC, Chol, LUV GM1, POPS, POPE	ThT, EM, CD	lipides anioniques diminuent l'auto-assemblage [163]
$A\beta_{40}$	GM1/Chol/SM, DOTAP, PG, PI	fluorescence, rouge Congo, EM	pas d'interaction avec lipides anioniques et cationiques à pH neutre, interaction avec glyco- lipides [140] [164]
$A\beta_{40}$	GM1/Chol/SM	LUV	CD, ThT, Structure secondaire d' $A\beta$ dé- spectroscopie pend des clusters de ganglio- UV sides [165]
$A\beta_{40}$	POPC/POPS, POPC/POPS/ gangliosides	LUV, micelles	ThT, RMN du interaction en présence de solide gangliosides [16]
$A\beta_{42}$	DOPC/DOPS, DOPC/DOPS/ SM/Chol, DOPC/DOPS/ SM/Chol/GM1	bicouche, LUV	microscopie interaction d' $A\beta$ sur les do- maines membranaires riches en GM1 augmente le phéno- mène de séparation de phase lipidique [166]

TABLE 1.7 – Récapitulatif bibliographique des études d'interaction d' $A\beta_{1-40}$  et/ou  $A\beta_{1-42}$  avec des modèles membranaires.

Ces études révèlent une grande diversité de résultats, parfois contradictoires.

McLaurin *et al* ont montré par le biais de techniques de perméabilisation de membranes que les peptides  $A\beta_{1-40}$  et  $A\beta_{1-42}$  interagissent uniquement avec les liposomes négativement chargés *via* des interactions électrostatiques [162]. Leur étude a aussi montré que la présence de lipides anioniques, PI en particulier, accélérât la formation des fibres.

Plus tard, Sabaté *et al* ont établi que le peptide  $A\beta_{1-40}$  interagit avec les lipides zwitterioniques (PC) [148]. Ils en déduisent qu'une interaction spécifique charge-charge n'est pas requise pour l'interaction d' $A\beta$ . Ils observent aussi que l'auto-assemblage du peptide est modifié en présence de ces lipides (ralentissement de la cinétique de l'agrégation). Ils concluent donc que le peptide  $A\beta$  s'insère partiellement dans la membrane *via* des interactions hydrophobes.

Ikeda *et al*, lors d'une étude sur le rôle des gangliosides dans l'interaction d' $A\beta_{1-40}$  avec les membranes, n'observent pas d'interaction ni avec les lipides anioniques, ni avec les lipides cationiques à pH neutre [164]. Ils concluent que ce ne sont pas les interactions hydrophobes qui gouvernent l'interaction avec  $A\beta$ . D'autre part, ils démontrent qu' $A\beta$  n'interagit avec les membranes qu'en présence de gangliosides *via* des liaisons hydrogènes et des interactions hydrophobes avec les groupes sucres des glycolipides.

La grande variabilité de résultats observés peut avoir deux origines :

- la source d'A $\beta$
- le type de système membranaire utilisé

La plupart des divergences dans les résultats rapportés pourraient être liées à la source d'A $\beta$  et à son état d'agrégation [102]. En effet, une grande majorité des études sont effectuées à l'aide de peptides synthétiques solubilisés au départ dans différents solvants organiques type HFIP, DMSO. La solubilisation et la monomérisation du produit lyophilisé représente une étape cruciale et délicate durant laquelle l'état d'agrégation du peptide ne peut être contrôlé. L'état du peptide est d'une grande importance dans le mécanisme d'interaction entre A $\beta$  et les membranes et l'hétérogénéité des échantillons formés contribue au manque de reproductibilité des expériences.

La seconde source de divergence provient du système membranaire utilisé. En effet, selon l'état d'organisation, monocouche ou bicouche, ou de fluidité de la membrane, la pression de surface, la température et le pH, les résultats observés peuvent être en total désaccord. Il est donc important de comparer des systèmes similaires.



## 1.6 Conclusions et objectifs de la thèse

Cette étude bibliographique nous a permis d'établir l'état des connaissances actuelles concernant le peptide  $A\beta_{1-42}$  impliqué dans la maladie d'Alzheimer. Ces dernières années, un tournant s'est opéré au sein de la communauté scientifique avec deux découvertes majeures :

1. Au cours de l'auto-assemblage d' $A\beta$ , des espèces intermédiaires présentant des caractéristiques structurales communes sont formées : petite taille et structure en feuillets- $\beta$  anti-parallèles. Il est maintenant admis que ce sont ces intermédiaires qui sont liés à la toxicité observée, les monomères et les fibres matures d' $A\beta$  ne présentant pas de toxicité. Le caractère transitoire de ces espèces complique leur étude, il est en effet difficile de les isoler et de les stabiliser.
2. La toxicité de ces intermédiaires est liée à leur interaction avec les membranes neuronales. Il existe de nombreuses hypothèses concernant le ou les mécanismes d'interaction. La multiplication des études sur l'interaction du peptide  $A\beta$  avec des membranes modèles révèle des résultats parfois contradictoires. Ces divergences pourraient s'expliquer par des difficultés de reproductibilité liées à l'état d'agrégation des peptides et à leur origine.

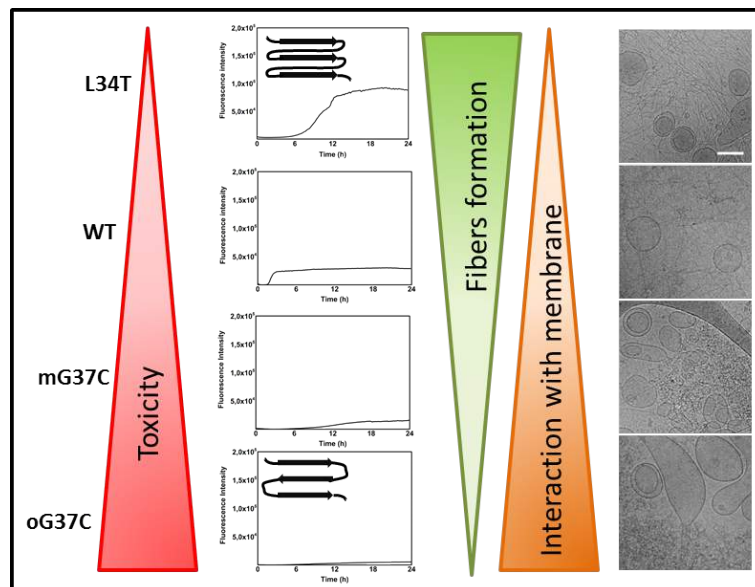
C'est dans ce contexte que nous avons développé une stratégie de recherche pour l'étude du peptide  $A\beta_{1-42}$  avec des membranes modèles. Nous avons, grâce à une collaboration avec l'équipe du professeur Cullin, utilisé des peptides produits *in vivo* dont l'état d'agrégation est contrôlé. Parmi les peptides un mutant oligomérique a été isolé et stabilisé. L'oligomère, constitué d'une dizaine de monomères présente une toxicité accrue dans la levure et les caractéristiques structurales communes aux espèces intermédiaires en feuillets- $\beta$  anti-parallèles. Ces caractéristiques en font un modèle oligomérique de choix pour comprendre les mécanismes d'interaction avec les membranes.

Les objectifs de ces travaux de thèse étaient :

- Comprendre l'interaction d'un oligomère toxique stable du peptide  $A\beta_{1-42}$  présentant une structure en feuillets- $\beta$  anti-parallèle avec des membranes modèles simples et établir la comparaison avec  $A\beta_{1-42}$ -WT.
- Étudier la dynamique de l'interaction du peptide  $A\beta_{1-42}$  et mutants avec des membranes modèles plus complexes.
- Caractériser le processus d'auto-assemblage "off ou on-pathway" des peptides et évaluer l'influence des lipides sur la fibrillation.

## Chapitre 2

# Étude de l'interaction des amyloïdes $A\beta_{1-42}$ avec des modèles membranaires simples : zwitterioniques *versus* anioniques





## 2.1 Introduction

Les peptides étudiés ont été produits *in vivo* dans la levure et présentent des toxicités variables. Le panel est constitué de quatre peptides : trois monomères et un oligomère stable. Parmi ces peptides, A $\beta_{1-42}$  (WT), un mutant moins toxique que WT dans la levure L34T et un mutant plus toxique que WT dans la levure G37C.

Le mutant G37C est très intéressant car lors de la dernière étape de purification des peptides, par chromatographie d'exclusion de taille, les deux espèces (monomère mG37C et oligomère oG37C) ont pu être isolées et caractérisées. Les autres mutants ne forment que des espèces monomériques.

Pour les expériences présentées dans cette étude, les peptides WT et L34T ont été injectés à l'état monomérique. Le mutant G37C a été injecté soit à l'état monomérique (mG37C) soit sous sa forme oligomérique (oG37C). Il a été montré que tous les monomères adoptaient une structure secondaire en feuillets- $\beta$  parallèles alors que l'oligomère se structure en feuillets- $\beta$  anti-parallèles [5]. De plus, l'auto-assemblage des monomères présentent la courbe caractéristique des amyloïdes en présence de ThT, indiquant la formation de fibres alors que l'oligomère G37C ne semblent pas en former.

La formation de l'oligomère (oG37C, taille : 12-14 mères) est un artefact de purification. L'oligomère est stabilisé par des ponts dissulfures ce qui en fait un modèle d'oligomère toxique stable présentant une structure en feuillets- $\beta$  anti-parallèles idéale pour des études de toxicité du peptide A $\beta_{1-42}$  et de son interaction avec les membranes.

Dans cette étude, nous avons examiné l'interaction des différents mutants d'A $\beta_{1-42}$  avec des modèles lipidiques membranaires tels que les monocouches à l'interface air-eau, les bicouches supportées ou les liposomes (LUV, *Large Unilamellar Vesicle*). Nous avons utilisé des systèmes de modèles membranaires simples composés soit de phosphatidylglycerol (DMPG, DOPG) pure soit de phosphatidylcholine (DMPC, DOPC), afin d'évaluer l'influence de la charge des têtes polaires des lipides sur l'interaction peptide/lipide et sur le processus d'auto-assemblage des peptides. PC, qui possède une tête polaire zwitterionique est connu pour être le principal lipide présent sur le feuillet externe des cellules eucaryotes. PG a été choisi pour sa tête polaire chargée négativement mais aussi pour ses groupements -OH de surface, qui peuvent être vu comme un modèle simpliste des gangliosides GM1, afin de mettre en évidence l'importance des interactions électrostatiques et des liaisons hydrogènes. La combinaison de différentes méthodes spectroscopiques telles que l'ellipsométrie, la fluorescence (fuite de calcéïne, fluorescence de la Thioflavine T), l'infrarouge (ATR-FTIR, PM-IRRAS) et la résonance de plasmon de surface (PWR) nous a permis d'évaluer les effets des peptides (A $\beta_{1-42}$ , L34T, mG37C et oG37C) sur des membranes en termes d'accumulation, de cinétiques d'interaction et de perturbation de l'intégrité membranaire. Les images de cryo-microscopie électronique à transmission (cryo-TEM) permettent une visualisation directe des dommages faits à la membrane. L'étude se décompose en deux parties : une première approche sur monocouches à l'interface air-eau puis en présence de bicouches lipidiques.

## 2.2 Interaction du peptide $A\beta_{1-42}$ avec des monocouches lipidiques à l'interface air-eau

Dans un premier temps des expériences d'interaction peptide/lipide ont été menées à l'interface air-eau en présence de monocouches lipidiques. Ces expériences faisaient échos aux résultats obtenus précédemment au sein de notre équipe lors de l'étude du peptide amyloïde Het's sur monocouches lipidiques simples par ellipsométrie et PM-IRRAS [167]. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'interaction entre les différents peptides  $A\beta_{1-42}$  et des lipides DMPC et DMPG à l'interface air-eau. La technique BAM-ellipsométrie nous permettra d'accéder à la morphologie du système et la technique de PM-IRRAS nous donnera la structure des peptides et l'organisation des lipides.

### 2.2.1 Principe de l'ellipsométrie et de la Spectroscopie InfraRouge de Réflexion Absorption par Modulation de Polarisation (PM-IRRAS)

#### 2.2.1.1 L'ellipsométrie

L'ellipsométrie est une technique de caractérisation de surfaces présentant l'avantage d'être non destructive, de permettre des suivis *in situ* et en temps réel et d'être applicable à une très large gamme d'échantillons (voir détail de la technique en annexe). Dans le cadre de l'étude de molécules biologiques à l'interface air-eau, elle permet l'observation de la morphologie de l'interface à une résolution de  $1\mu\text{m}$ . Les variations de la morphologie de la surface observées sont liées aux changements d'indice de réfraction témoins de la modification de l'interface suite à l'interaction. Cette technique est couplée à la tensiométrie qui permet de mesurer les variations de pression de surface. Le contrôle de la tension de surface est utilisé pour obtenir des informations sur l'adsorption ou l'insertion des peptides dans les monocouches lipidiques.

#### 2.2.1.2 Le PM-IRRAS

Le PM-IRRAS (Spectroscopie InfraRouge de Réflexion Absorption par Modulation de Polarisation) est une technique de spectroscopie vibrationnelle non destructive qui permet d'accéder aux informations structurales, à la nature chimique et à l'organisation conformationnelle des molécules présentes à l'interface air-eau [168] [169] [170] (voir détails de la technique en annexe). La technique de PM-IRRAS peut elle aussi être couplée à la tensiométrie. Pour nos études, nous pouvons suivre l'organisation des lipides ainsi que la conformation des peptides.

### 2.2.2 Résultats

La première étape fût d'évaluer le comportement des peptides (WT et oG37C) à l'interface air-eau.

Les différents peptides ont été injectés en sous-phase afin d'observer leur comportement. Les images ellipsométriques (fig. 2.1) obtenues montrent pour les deux peptides une répartition

homogène à la surface, confirmée par une augmentation de la pression de surface jusqu'à environ 15 mN/m ce qui est du même ordre de grandeur que les valeurs obtenues dans des études pour le peptide  $A\beta_{1-40}$  [155] [171]. En utilisant un index de 1.45, les épaisseurs mesurées sont respectivement 40 Å et 53 Å pour WT et oG37C.

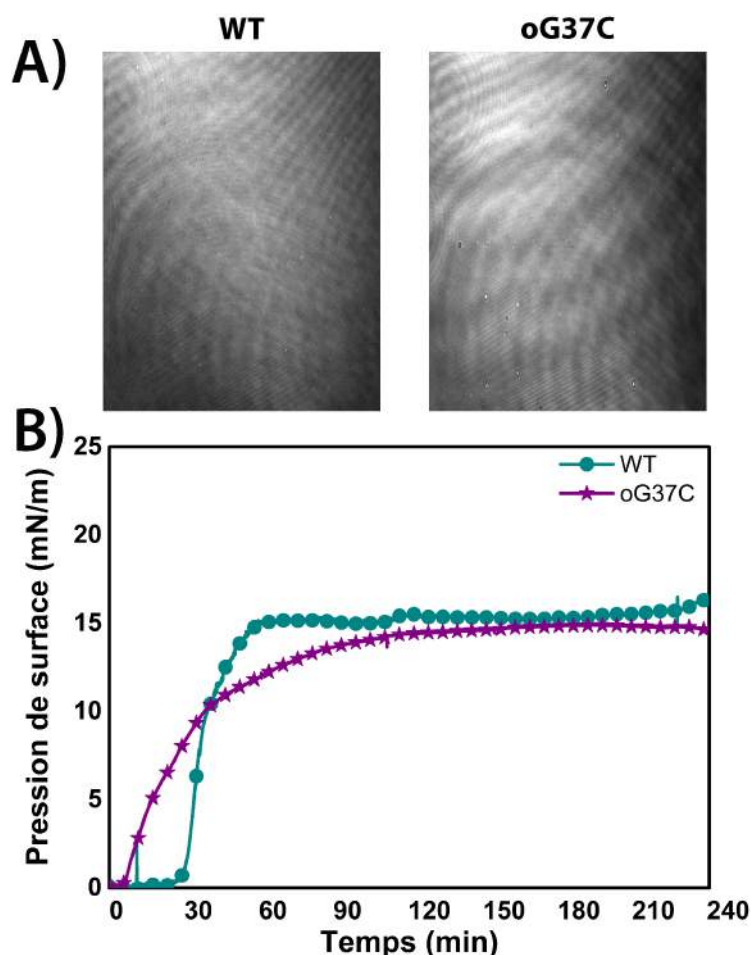


FIGURE 2.1 – A) Images ellipsométriques des peptides WT (cyan) et oG37C (violet) à l'interface air-eau (Tampon A = Tris-HCl 10mM, NaCl 150 mM, DTT 5mM, pH 7,4). La concentration de peptides est de 1  $\mu$ M dans la cuve. Les images sont enregistrées environ 1h après injection, taille des images 450x670  $\mu$ m. B) Courbes de pression de surface en fonction du temps pour les peptides WT et oG37C.

Les courbes de pression obtenues sont représentatives de la cinétique d'accumulation des peptides à l'interface air-eau. On remarque que l'oligomère G37C présente une forte affinité pour le milieu hydrophobe ce qui se traduit par une accumulation immédiate à l'interface air-eau. Le monomère WT adopte le même comportement après une phase de latence d'environ 30 minutes qui peut être attribué à une réorganisation de WT. En effet, on peut supposer que, contrairement à l'oligomère qui est déjà dans une configuration présentant une certaine affinité pour l'interface, le monomère WT doit tout d'abord s'organiser et former des oligomères avant d'interagir avec l'interface air-eau.

Les spectres PM-IRRAS (fig 2.2) d' $A\beta_{1-42}$  (WT) et oG37C montrent une structure secondaire majoritairement en feuillets- $\beta$  anti-parallèles : présence des deux composantes dans le massif

amide à 1625 cm<sup>-1</sup> et 1690 cm<sup>-1</sup>. L'étude en solution des peptides par ATR-FTIR montrait que les espèces monomériques adoptaient une structure en feuillets- $\beta$  parallèles alors que l'oligomère G37C se structurait en feuillets- $\beta$  anti-parallèles [5]. L'interface air-eau semble engendrer des variations de structure comme observé précédemment avec l'amyloïde Het-s [167]. Ceci peut s'expliquer par une organisation préférentielle des peptides, liée à une forte affinité pour le milieu hydrophobe.

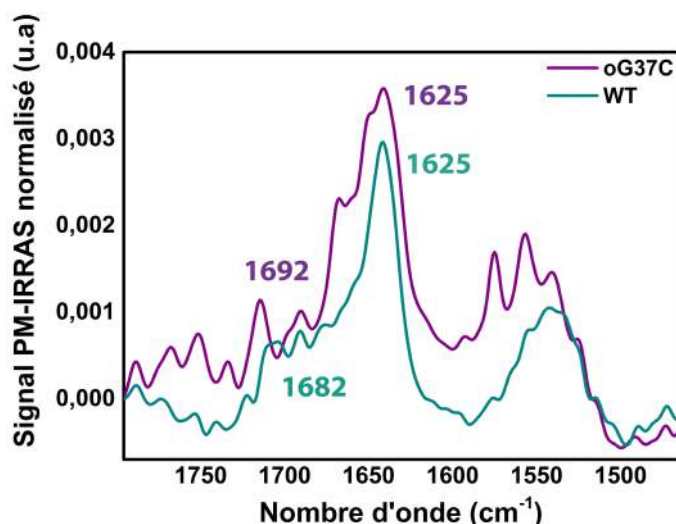


FIGURE 2.2 – Spectres PM-IRRAS des peptides amyloïdes WT (cyan) et oG37C (violet) à l'interface air-eau (Tampon A). La concentration de peptides est de 1  $\mu$ M dans la cuve à température ambiante. La pression finale à l'interface était de 10.9 et 13.5 mN/m respectivement.

Les interactions peptide/monocouches lipidiques ont ensuite été évaluées. Les monocouches lipidiques ont été formées à l'interface air-eau et contrôlées grâce à la tension de surface. La solution de lipide est déposée en surface jusqu'à atteindre environ 28 mN/m. Les mesures ont tout d'abord été faites en présence de monocouches zwitterioniques DMPC. Les images obtenues en ellipsométrie au bout de 3h d'incubation montrent la formation de gros objets à la surface (fig 2.3).

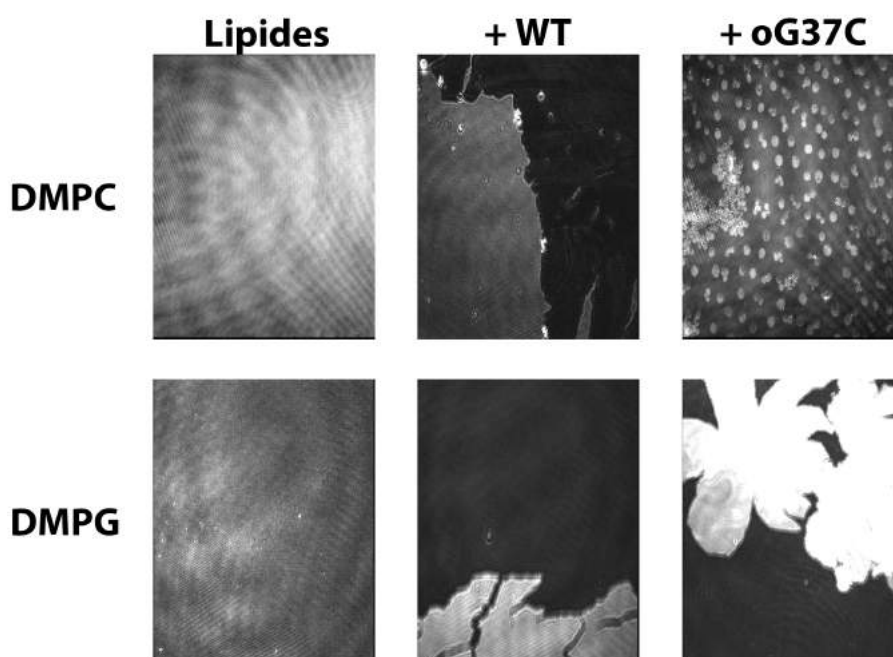


FIGURE 2.3 – Images ellipsométriques des monocouches DMPC (haut) et DMPG (bas) avant et après injection des peptides WT et oG37C en sous-phase (Tampon A). La pression initiale des monocouches lipidiques est d'environ 28 mN/m. La concentration de peptides est de 1  $\mu$ M dans la cuve. Les images sont enregistrées environ 3h après injection, taille des images 450×670  $\mu$ m.

L'interaction d' $A\beta_{1-42}$  (WT) provoque la formation de larges plaques que l'on a attribuées aux peptides. Ces "radeaux" peptidiques sont très dynamiques à la surface. Les images obtenues correspondent à un temps court durant lequel les plaques sont sur le trajet optique. Les plaques formées ne recouvrent pas l'intégralité de la surface. Le mutant G37C quand à lui agit différemment et des objets de faible taille et sphériques sont formés. Ces changements morphologiques importants conduisent cependant à un changement de la pression de surface négligeable (table 2.1).

	Pression de surface maximale (mN/m)	
	WT	oG37C
Peptides seuls	15,7	14,1
DMPC	29.4	30.8
DMPG	28.7	28.8

TABLE 2.1 – Valeurs de pression de surface maximale correspondant aux peptides seuls et à l'insertion des peptides dans les monocouches de lipide (DMPC et DMPG) en mN/m.

Les peptides WT et oG37C ont aussi été testés avec des monocouches anioniques DMPG (fig 2.3). Des comportements similaires à ceux obtenus avec les monocouches DMPC sont observés avec la formation de plaques peptidiques mobiles à la surface et pressions de surface semblables à la monocouche seule (table 2.1).

Les mesures effectuées nous ont permis d'accéder à l'épaisseur de la couche avant et après



l'injection des peptides. Dans le cadre de nos expériences, pour les films très minces, l'angle ellipsométrique  $\Delta$  est très sensible à l'épaisseur de la couche lipidique. La différence de l'angle  $\Delta$  mesuré par rapport à l'angle  $\Delta$  du substrat nu  $\delta\Delta = \Delta_0 - \Delta$  est proportionnel à l'épaisseur. Grâce à l'application d'un modèle optique inclus dans le logiciel ellipsométrique, nous avons pu déduire l'épaisseur des films formés à l'interface air-eau pour un indice de réfraction donné (nous avons choisi 1,45). On peut donc déduire la variation d'épaisseur de la couche lipidique d'après le changement de l'angle ellipsométrique  $\Delta$ . Là encore, une faible augmentation a pu être observée (entre +3 et +5 ) en présence de DMPC et pas de modification de l'épaisseur en présence de DMPG (table 2.2).

Angles ellipsométriques ( $\delta\Delta$ , $\psi$ en degrés) et épaisseur de la couche (Å)						
	Monocouche lipidique		Monocouche lipidique en interaction avec			
			WT		oG37C	
	$ \delta\Delta  =  \Delta - \Delta_0 $ $\psi$	Épaisseur (Å)	$ \delta\Delta $ $\psi$	e (Å)	$ \delta\Delta $ $\psi$	e (Å)
DMPC	5 $\pm$ 0.5	18 $\pm$ 1.6	6 $\pm$ 0.3	21 $\pm$ 1.1	7	25
	2,41 $\pm$ 0.02		2,44 $\pm$ 0.02		2.41 $\pm$ 0.02	
DMPG	4,5 $\pm$ 0.4	16 $\pm$ 1.6	4,4	16	5,2 $\pm$ 0.3	19 $\pm$ 1
	2.41 $\pm$ 0.02		2.40 $\pm$ 0.05		2.38 $\pm$ 0.03	

TABLE 2.2 – Angles ellipsométriques et épaisseur maximale des monocouches lipidiques avant et après injection des peptides dans la sousphase (tampon A). La pression initiale des monocouches était d'environ 28 mN/m. La concentration des peptides était fixée à 1  $\mu$ M. L'épaisseur est déterminée en utilisant une valeur moyenne de 1,45 pour indice de réfraction.

Les épaisseurs relevées ne correspondent pas aux radeaux observés sur les images ellipsométriques mais à une valeur moyenne au point le plus bas. Les épaisseurs des radeaux n'ont pas pu être mesurés car, trop fluides, ils ne restent pas suffisamment longtemps sous le faisceau.

Les spectres PM-IRRAS (fig 2.4) obtenus en présence de monocouches de DMPC et DMPG viennent confirmer ces observations puisque des comportements similaires ont été mesurés.

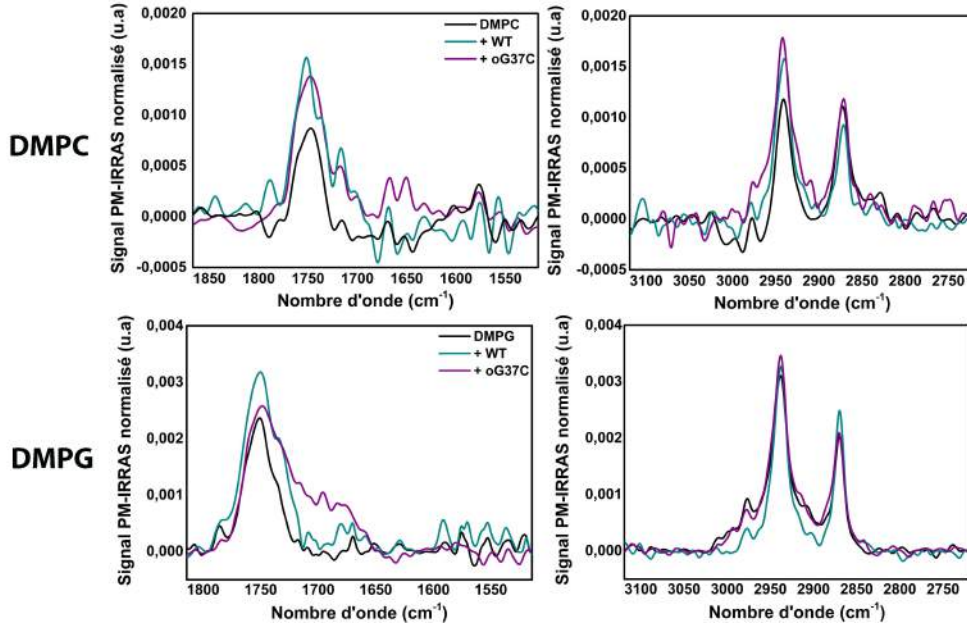


FIGURE 2.4 – Spectres PM-IRRAS à l'interface air-eau lors d'interaction des monocouches de phospholipides (courbes noires) DMPC (haut) et DMPG (bas) avec les peptides WT (cyan) et oG37C (violet). Les peptides ont été introduits dans la sousphase (tampon A) à une concentration d'  $1 \mu\text{M}$ . La pression initiale des monocouches phospholipidiques était d'environ  $28 \text{ mN/m}$ . Les spectres correspondent à la bande amide (à gauche) et aux bandes de vibrations des  $\text{CH}_2$  des lipides (à droite).

Étonnement, la zone du spectre correspondant aux lipides ne semble pas impactée par la présence des peptides (table 2.3). De plus, dans la région  $1800\text{-}1500 \text{ cm}^{-1}$  seules les bandes caractéristiques du  $\text{C}=\text{O}$  ester des lipides sont observables à  $1730\text{-}1735 \text{ cm}^{-1}$ . Aucune amide I ou amide II n'est observée quelque soit la nature du lipide utilisé.

	Nombres d'onde ( $\text{cm}^{-1}$ )					
	DMPC			DMPG		
	Lipides seuls	WT	oG37C	Lipides seuls	WT	oG37C
$\nu_{as} \text{ CH}_2$	2918.7	2920.7	2922.6	2918.7	2918.7	2918.7
$\nu_s \text{ CH}_2$	2852.9	2852.1	2852.2	2851.2	2850	2851.2
$\nu \text{ C}=\text{O}$ ester lipides	1730.7	1734.6	1730.8	1736.6	1735.6	1734.6

TABLE 2.3 – Nombres d'onde obtenus par PM-IRRAS avant et après injection des peptides dans la sousphase (tampon A). La pression initiale des monocouches était d'environ  $28 \text{ mN/m}$ . La concentration des peptides était fixée à  $1 \mu\text{M}$ .

### 2.2.3 Discussion

Les résultats d'ellipsométrie montrent une forte modification de la morphologie des différentes monocouches en interaction avec les différents peptides. Cependant, ces changements morpholo-

giques majeurs ne conduisent pas à une modification de la pression de surface importante. Les spectres PM-IRRAS ne montrent pas la présence des peptides en interaction avec les lipides.

Ces résultats peuvent s'expliquer, car, comme nous l'avons dit précédemment, les images obtenues avec la technique de l'ellipsométrie correspondaient à des objets dynamiques à l'interface air-eau. Ces objets passent donc sur le trajet optique de manière intermittente et seule une observation accrue de l'échantillon permet de les détecter. Dans le cas du PM-IRRAS, chaque mesure prend plusieurs minutes ce qui laisse le temps à l'interface de se modifier et aux radeaux peptidiques observés en ellipsométrie de s'écarter du trajet optique.

L'ensemble des données obtenues ne nous permettent pas de conclure sur une interaction entre  $A\beta_{1-42}$  et deux compositions lipidiques opposées (DMPC et DMPG).

## 2.3 Interaction des amyloïdes $A\beta_{1-42}$ avec des bicouches lipidiques

Notre objectif a été de tester l'effet des différents peptides sur l'intégrité membranaire, de mesurer l'accumulation des peptides sur les deux modèles lipidiques, zwitterionique et anionique, de révéler l'impact des lipides sur l'auto-assemblage des différents peptides d' $A\beta_{1-42}$  et finalement d'observer la morphologie de l'ensemble du système lipide/peptide. Différentes expériences ont été menées pour caractériser l'interaction : détection d'un fluorophore, la calcéïne, pour évaluer l'effet des peptides sur les membranes modèles, la résonance de plasmons de surface (PWR) pour étudier l'accumulation des peptides sur des bicouches supportées, la fluorescence de la Thioflavine T pour mesurer l'impact de lipides sur l'auto-assemblage des peptides et enfin, la cryo-microscopie électronique à transmission pour observer les changements morphologiques des liposomes en interaction avec les peptides. Nous avons étudié l'effet d' $A\beta_{1-42}$ -WT, du mutant moins toxique dans la levure : L34T, et du mutant plus toxique dans la levure : G37C sous sa forme monomérique mG37C et oligomérique oG37C. Pour toutes les expériences, les peptides ont été injectés à l'état de monomère, ou oligomère dans le cas du mutant oG37C.

### 2.3.1 Mise en évidence de l'effet d' $A\beta_{1-42}$ sur l'intégrité membranaire

#### 2.3.1.1 Fluorescence de la calcéïne

La calcéïne (aussi connu sous le nom de fluorexon) est un fluorophore très largement utilisé dans le milieu de la biophysique depuis sa découverte dans les années 60. Au départ employé dans la détection de calcium, son utilisation a été généralisée à l'étude de la fusion et la lyse des vésicules dans les années 80 [172] [173]. L'importance de ce fluorophore provient de sa caractéristique d'extinction de fluorescence à forte concentration. C'est cette propriété qui est exploitée lors des expériences de perméabilisation membranaire. La calcéïne à forte concentration (70 mM) est encapsulée dans des liposomes. Les liposomes ainsi formés ne présentent aucune fluorescence. Les agents perturbateurs, les peptides d' $A\beta_{1-42}$  dans notre cas, sont alors ajoutés aux liposomes

à différentes concentrations afin de tester leur efficacité et leur impact sur l'intégrité membranaire. S'il y a perturbation de la membrane, la calcéïne sera relarguée dans le milieu et sera alors détectée par fluorescence. La calcéïne est excitée à une longueur d'onde de 485 nm et émet de la fluorescence à 520 nm. Le pourcentage de calcéïne libérée est calculé selon l'équation suivante (éq 2.1) :

$$L(t) = [(F_t - F_0)/(F_{max} - F_0)] \times 100 \quad (2.1)$$

Où  $L(t)$  est le pourcentage de calcéïne libérée (%),  $F_t$  est l'intensité de fluorescence mesurée au temps  $t$ ,  $F_0$  est l'intensité de fluorescence au temps  $t = 0$  et  $F_{max}$  est l'intensité de fluorescence après l'ajout de Triton X-100. Le Triton X-100 est un détergent permettant d'obtenir la valeur de fluorescence correspondant à 100% de fuite de calcéïne.

### 2.3.1.2 Résultats

La mesure de fluorescence de la calcéïne a permis de tester l'effet des différents peptides (WT, L34T, mG37C et oG37C) sur l'intégrité membranaire de liposomes composés à 100% de phospholipides zwitterioniques DOPC, 100% anioniques DOPG et d'un mélange 70/30 d'EggPC et de DOPG. La concentration des liposomes contenant la calcéïne est fixée à  $10\mu\text{M}$  et des concentrations croissantes de peptides sont ajoutées pour obtenir des ratios lipide/peptide ( $R_i$ ) de 2 à 1000. Les cinétiques de perméation des membranes sont suivies par spectroscopie de fluorescence pendant 4h (fig 2.5).

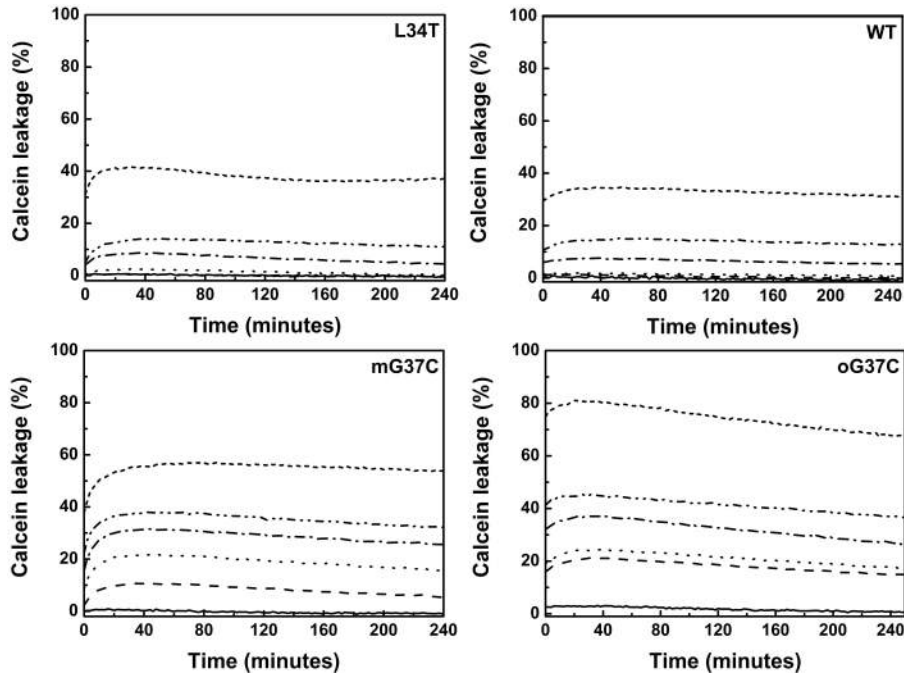


FIGURE 2.5 – Pourcentage de calcéïne libérée en fonction du temps par des liposomes de DOPG à  $20\mu\text{M}$  induite par les peptides L34T (haut gauche), WT (haut droite), mG37C (bas gauche) et oG37C (bas droite) pendant 4h à  $25^\circ\text{C}$  à différentes concentrations de peptides 0.01, 0.1, 0.2, 0.5, 1 et  $5\mu\text{M}$ . Le maximum d'externalisation de la calcéïne est obtenue par l'ajout d' $1\mu\text{L}$  de Triton X-100 à 10 % dans chaque puit de la microplaque.

Nous avons pu observer que les peptides provoquaient d'importantes fuites de calcéïne des

vésicules anioniques (DOPG) (Fig 2.6) de manière instantanée. Il n'y a pas de phase de latence observée. Après 30 min d'incubation, le plateau est atteint et ce pour tous les peptides mais avec différentes intensités de fluorescence. Au ratio le plus élevé (Ri2) correspondant à une concentration peptidique de 5  $\mu$ M, l'oligomère G37C provoque jusqu'à 80% de fuite de calcéïne pour les liposomes de DOPG. Au même ratio, les autres peptides induisent seulement 30, 40 et 60 % de fuites respectivement pour WT, L34T et le monomère G37C. Les résultats montrent que WT et L34T adoptent un comportement similaire en présence de liposomes anioniques alors que le mutant G37C sous sa forme monomérique et oligomérique induit des fuites de calcéïnes plus importantes.

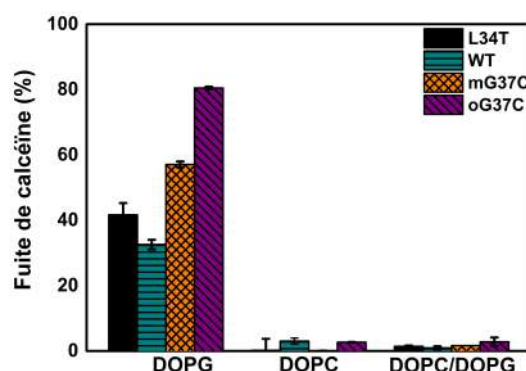


FIGURE 2.6 – Pourcentage de calcéïne libérée par des liposomes de DOPG (à gauche), DOPC (au milieu) et un mélange de DOPC/DOPG (70 :30) (à droite) en interaction avec L34T (noir), WT (cyan), mG37C (orange) et oG37C (violet). La concentration des lipides était fixée à 10  $\mu$ M, les peptides ont été ajoutés aux liposomes à un ratio lipide/peptide Ri 2 (concentration finale 5 $\mu$ M). Le maximum d'externalisation de la calcéïne est obtenue après 4h d'incubation à 25°C par l'ajout d'1 $\mu$ L de Triton X-100 à 10 % dans chaque puits de la microplaque.

En revanche, les fuites observées dans le cas de l'interaction des peptides avec les liposomes DOPC se sont avérées négligeables (moins de 3% en moyenne) et ce quelque soit le peptide étudié. Ces résultats montrent une faible interaction des peptides d'A $\beta_{1-42}$  avec les membranes zwitterioniques contre une forte efficacité envers les lipides anioniques. Les mêmes essais ont été effectués avec le mélange lipidique PC/PG (70/30). Les résultats obtenus sont semblables à ceux observés avec les liposomes 100% zwitterioniques (DOPC). Ceci peut s'expliquer par une proportion de lipides anioniques trop faible pour déclencher l'interaction avec les peptides.

D'autre part, des expériences ont été menées dans le but de déterminer quelles espèces étaient responsables de l'interaction avec les liposomes de DOPG. Pour ce faire des mesures de fuite de calcéïne de liposomes de DOPG ont été effectuées en présence de fibres matures d'A $\beta_{1-42}$  des différents mutants (une semaine) (fig 2.7). Ces essais ont montré une faible efficacité des fibres sur les liposomes ce qui corrobore l'idée que les fibres amyloïdes ne sont pas à l'origine de la toxicité. Nous avons obtenu des résultats similaires pour tous les peptides, même pour l'oligomère G37C. Ce dernier étant une espèce stable on pourrait s'attendre à ce qu'il induise la perméabilisation des membranes, comme observé précédemment. Néanmoins, il est important de noter que, même si l'oligomère G37C n'est pas capable de former des fibres, il peut s'agréger et former des assemblages plus importants au cours du temps.

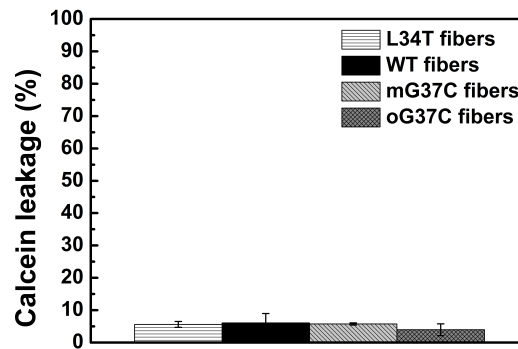


FIGURE 2.7 – Pourcentage de calcéïne libérée après 2h d’incubation avec  $5\mu\text{M}$  de fibres peptidiques avec des liposomes de DOPG. L34T (blanc), WT (noir), mG37C (gris clair) et oG37C (gris foncé). La concentration des lipides était fixée à  $20\mu\text{M}$ . Le maximum d’externalisation de la calcéïne est obtenue par l’ajout d’ $1\mu\text{L}$  de Triton X-100 à 10 % dans chaque puits de la microplaque.

### 2.3.1.3 Discussion

Les interactions des peptides avec les liposomes de DOPC ont mené à des fuites de calcéïne inférieures à 3% et ce quelque soit le peptide étudié. Ceci résulte probablement de la faible affinité des peptides d’ $A\beta$  pour les membranes zwitterioniques. En effet, une faible interaction entre les lipides zwitterioniques tels que la phosphatidylcholine et  $A\beta$  soluble ( $A\beta_{1-40}$  et  $A\beta_{1-42}$ ) a été démontré, alors que  $A\beta_{1-42}$  montre une forte capacité à interagir avec les lipides chargés négativement [163], [162].

Cependant, la charge nette d’ $A\beta_{1-42}$  est de -2.8 à pH physiologique [174]. La force motrice d’interaction ne semble pas être d’origine électrostatique au regard des résultats obtenus avec le lipide DOPC montrant une faible affinité. La forte interaction observée avec les lipides anioniques (PG) pourrait s’expliquer par la formation de liaisons hydrogènes entre les chaînes latérales des peptides et les groupes -OH de PG [16] [164] [165]. Dans la littérature, plusieurs auteurs ont établi une interaction spécifique entre  $A\beta_{1-40}$  [164] [175] et des clusters de gangliosides (GM1) présents dans les membranes sous forme de microdomaines. Les gangliosides contiennent de nombreux groupes -OH comme c’est le cas pour la tête polaire des lipides PG.

Si on compare les différents mutants, on observe que le monomère L34T agit comme le sauvage (WT) alors que le mutant G37C induit la libération d’une plus grande quantité de fluorophore comparé à WT. La perméabilisation des liposomes anioniques (DOPG) a été observée pour des concentrations en mutant G37C plus faibles. L’augmentation de la fluorescence commence à  $0.1\mu\text{M}$  pour G37C contre  $1\mu\text{M}$  pour le WT. Cette différence peut être due soit à une meilleure affinité du mutant G37C pour les membranes, soit à sa capacité à réorganiser les bicouches lipidiques. Afin d’examiner plus en détail ce point, une technique complémentaire basée sur la résonance de plasmon a été utilisée.

## 2.3.2 La résonance de plasmons pour l'étude de l'accumulation d' $A\beta_{1-42}$ sur des bicouches supportées

Des expériences de résonance de plasmons aux ondes guidées (PWR) ont été effectuées afin de suivre l'interaction lipide/peptide et de déterminer l'effet des peptides sur l'organisation des bicouches supportées de DOPC et DOPG.

### 2.3.2.1 Principe de la résonance de plasmons aux ondes guidées (PWR)

#### 2.3.2.1.1 La spectroscopie PWR

La spectroscopie PWR (Plasmon Waveguide Resonance) est une technique de résonance de plasmon de surface, comme la SPR. Ces techniques permettent d'obtenir des informations d'interaction, des constantes de dissociation et de cinétique des protéines sur des bicouches lipidiques. La principale différence entre la PWR et la SPR est la présence d'une couche de silice déposée sur la couche de métal [176]. Cette couche de silice agit comme un guide d'onde ce qui permet d'obtenir deux pics bien distincts en utilisant une lumière polarisée. Chaque pic correspond à une polarisation perpendiculaire ( $-s$ ) ou parallèle ( $-p$ ) au plan incident. Le système PWR est idéal pour l'étude des systèmes anisotropes, et particulièrement dans le cas des membranes et de leurs interactions avec des peptides. Nous obtenons les informations classiques de constantes de dissociation et de cinétique avec en plus une information sur l'orientation des systèmes étudiés (voir détails de la technique en annexe) [177] [178].

### 2.3.2.2 Résultats

Dans un premier temps, une bicouche supportée a été formée sur la surface du prisme. Les décalages positifs (vers des valeurs angulaires plus élevées) du minimum de résonance observés en polarisation  $-p$  ( $\Delta p$ ) et en polarisation  $-s$  ( $\Delta s$ ) après le dépôt des lipides sur le prisme sont caractéristiques d'une bicouche lipidique organisée ( $\Delta p$  autour de 120 mdeg et  $\Delta s$  autour de 100mdeg) (fig 2.8).

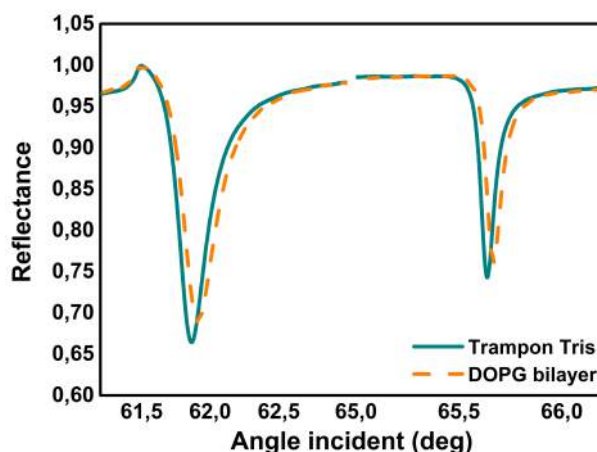


FIGURE 2.8 – Spectres PWR obtenus en polarisations  $-p$  (autour de 62 degrés, à gauche de la zone spectrale) et  $-s$  (autour de 65,5 degré, à droite de la zone spectrale) obtenus avant (cyan) et après la formation d'une bicouche supportée de DOPG (orange) dans le tampon A.

Les peptides sont ensuite ajoutés à une concentration fixée à 5  $\mu$ M dans la cellule de PWR et la position du minimum de résonance est enregistrée pendant 24h (fig 2.9).

La figure 2.9 présente les variations d'angles de résonance p et s en fonction du temps après injection des peptides, indiquée par la flèche.

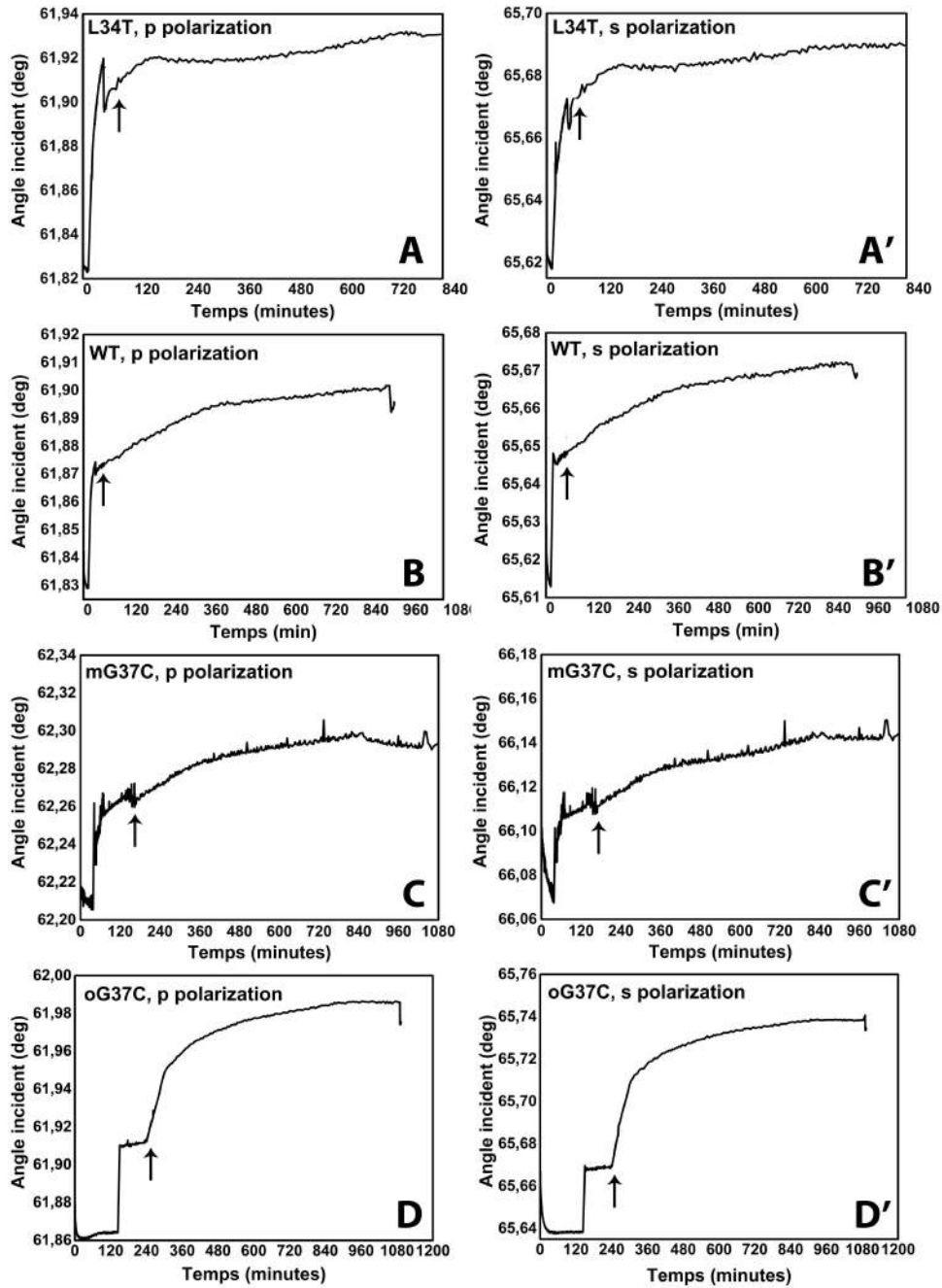


FIGURE 2.9 – Variation des angles de résonance lors de l'interaction bicouche supportée de DOPG avec les différents peptides L34T, WT, mG37C et oG37C en fonction du temps, respectivement en polarisation  $-p$  (A, B, C et D) et en polarisation  $-s$  (A', B', C', et D'). Les peptides ont été injectés pour une concentration finale de 5  $\mu$ M. La flèche noire indique le temps de l'injection des peptides.



Après l'injection du peptide (flèche noire), les variations d'angles de résonance sont suivies pendant 24h, puis la cellule PWR est rincée. Une faible diminution de l'angle de résonance est observée sur les courbes cinétiques de la figure 2.9 attribuée à la disparition de la contribution des espèces contenues dans le volume de la cellule, n'ayant pas interagi avec la bicouche supportée. Les différences de valeurs obtenues avant et après rinçage sont considérées comme étant négligeables car elles ne reflètent qu'une population minoritaire n'ayant pas interagi avec la bicouche. Ces faibles diminutions sont le signe d'une interaction spécifique entre les peptides et les bicouches anioniques. Le décalage angulaire positif, c'est à dire entraînant une augmentation de l'angle de résonance, observé en polarisation *-s* et en polarisation-*p* après l'ajout des différents peptides, indique une augmentation globale de l'indice de réfraction, ce qui est la conséquence directe de l'augmentation de masse due au dépôt des peptides sur la membrane lipidique.

Le tableau 2.4 répertorie les valeurs au plateau des angles de résonance obtenues pour chaque peptide en interaction avec des bicouches supportées de DOPG, et ce pour chaque polarisation. L'ajout de peptide induit des variations angulaires équivalentes dans les deux polarisations indiquant que les peptides n'adoptent pas une orientation préférentielle en interagissant avec la bicouche. L'interaction peptide/membrane est isotrope. Les résultats montrent que les peptides injectés en tant que monomères (WT, L34T et mG37C) induisent une variation de l'angle de résonance plus faible que l'oligomère oG37C sur des bicouches de DOPG : 28 mdeg pour WT contre 77.5 mdeg pour l'oligomère (valeurs correspondant à la moyenne des décalages angulaires obtenus dans les deux polarisations, table 2.4). L'augmentation de l'épaisseur a été évaluée à +1.5 nm pour les peptides injectés en tant que monomères (WT, L34T et mG37C) et à +5 nm pour l'espèce oligomérique oG37C. Ces valeurs ont été obtenues par des ajustements de courbes basés sur les équation de Fresnel et le formalisme de matrices et ont été effectués avec le logiciel Winspall (Worm J. Winspall version 3.02, 2009).

	L34T		WT		mG37C		oG37C	
	s	p	s	p	s	p	s	p
Décalage angulaire total (mdeg)	26	25	26	32	27	25	81	74
	$\pm 0.71$	$\pm 9.89$	$\pm 1.41$	$\pm 5.66$	$\pm 1.41$	$\pm 2.83$	$\pm 7.07$	$\pm 0.71$
Epaisseurs correspondantes (nm)	1.5		1.5-2.5		1.5		4.5-5	

TABLE 2.4 – Valeurs des maxima d'angles de résonance obtenus après l'ajout des peptides sur une bicouche de DOPG. Augmentation de l'épaisseur de la membrane due à l'injection des peptides.

La technique de PWR, est généralement utilisée pour la mesure de constantes d'affinité entre molécules. Dans le cas des amyloïdes, il y a co-existence de l'auto-assemblage des peptides simultanément à leur interaction avec les lipides. Il n'était donc pas possible de déterminer de manière assurée des constantes d'affinités car il est impossible de différencier les deux processus et d'établir l'espèce qui interagit [179].

L'ajustement des courbes cinétiques expérimentales représentées aux figures 2.10 et 2.11 ont

permis de déterminer des constantes cinétiques d'accumulation relatives.

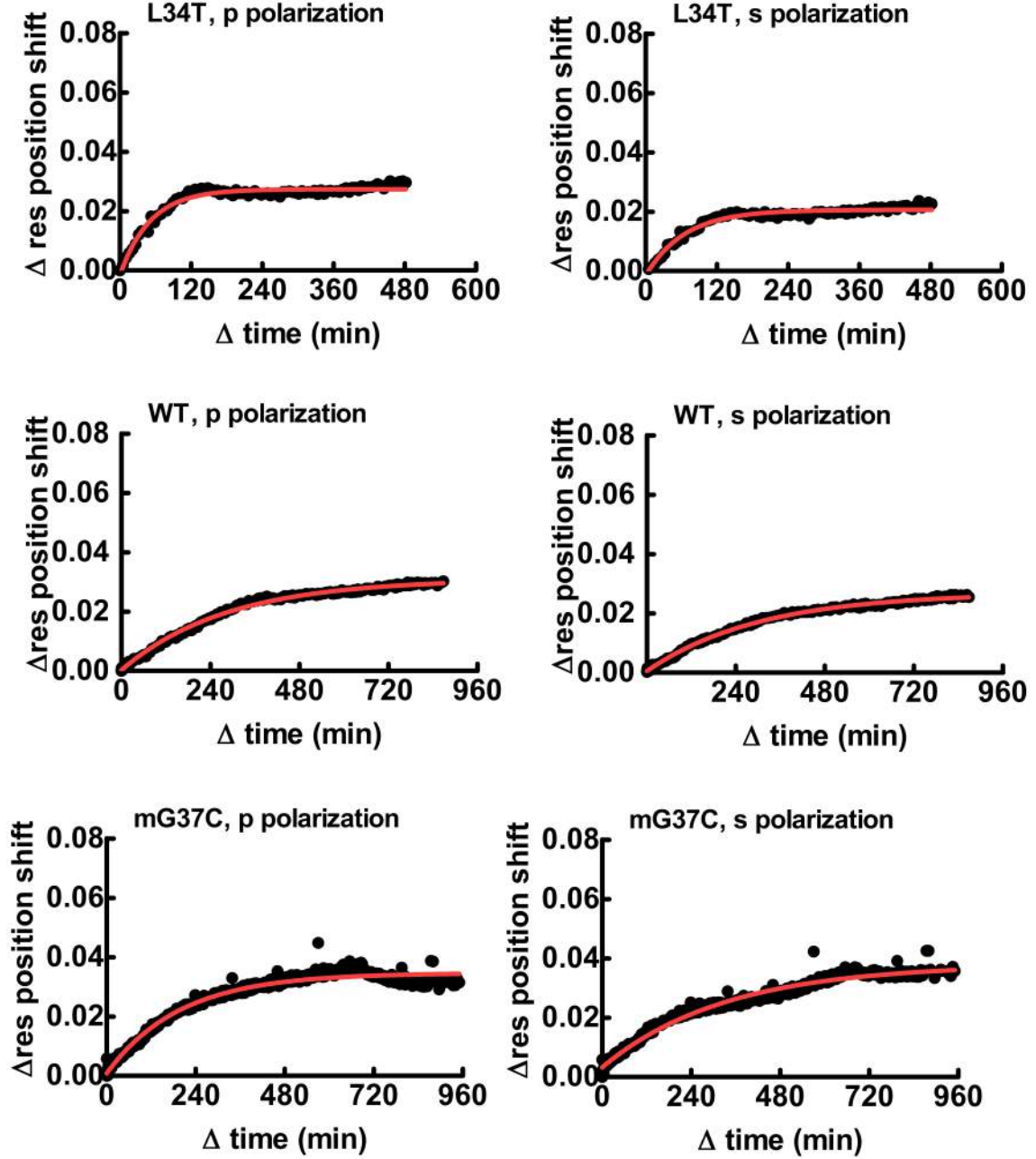


FIGURE 2.10 – Cinétique de l'interaction des peptides avec des bicouches de DOPG obtenues par analyse de l'évolution de l'angle de résonance en polarisation -p (à gauche) et -s (à droite) en fonction du temps. Les courbes rouges correspondent à l'ajustement des données cinétiques (courbes pointillées noires) en prenant un modèle cinétique d'ordre 1.

À notre connaissance, les constantes cinétiques mesurées ici sont les premières concernant l'interaction d'  $A\beta_{1-42}$ . Pour tous les peptides injectés sous forme monomérique (WT, L34T et mG37C) les données cinétiques peuvent être ajustées par une équation exponentielle à une phase avec le logiciel GraphPad Prism. Ce type de cinétique d'interaction pourrait correspondre à l'ancrage du peptide sur la membrane (éq 2.2).

$$Y = Y_0 + (Y_{Plateau} - Y_0)(1 - e^{-Kx}) \quad (2.2)$$

$Y_0$  correspond à la valeur en Y au temps  $t = 0$ .  $Y_{plateau}$  est la valeur en Y pour  $t = \infty$ . K est la constante de vitesse exprimée en  $min^{-1}$ .

Cette équation décrit une cinétique d'association de pseudo-premier ordre correspondant à l'interaction entre un ligand et son récepteur ou un substrat et une enzyme. Pendant chaque intervalle de temps une certaine fraction des récepteurs libres devient occupée. Mais au court du temps, de moins en moins de récepteurs sont disponibles et donc de moins en moins de ligands peuvent se lier. Ce phénomène se traduit sur la courbe par la formation d'un plateau.

Sur la figure 2.11 sont représentés les ajustements des courbes cinétiques de l'oligomère G37C en interaction avec des bicouches supportées de DOPG en utilisant une équation exponentielle à une phase. Le résultat obtenu montre bien que la courbe expérimentale ne peut pas être correctement ajustée avec ce type d'équation et confirme donc que l'interaction de l'oligomère G37C avec une bicouche anionique diffère de celle des espèces monomériques (WT, L34T et mG37C).

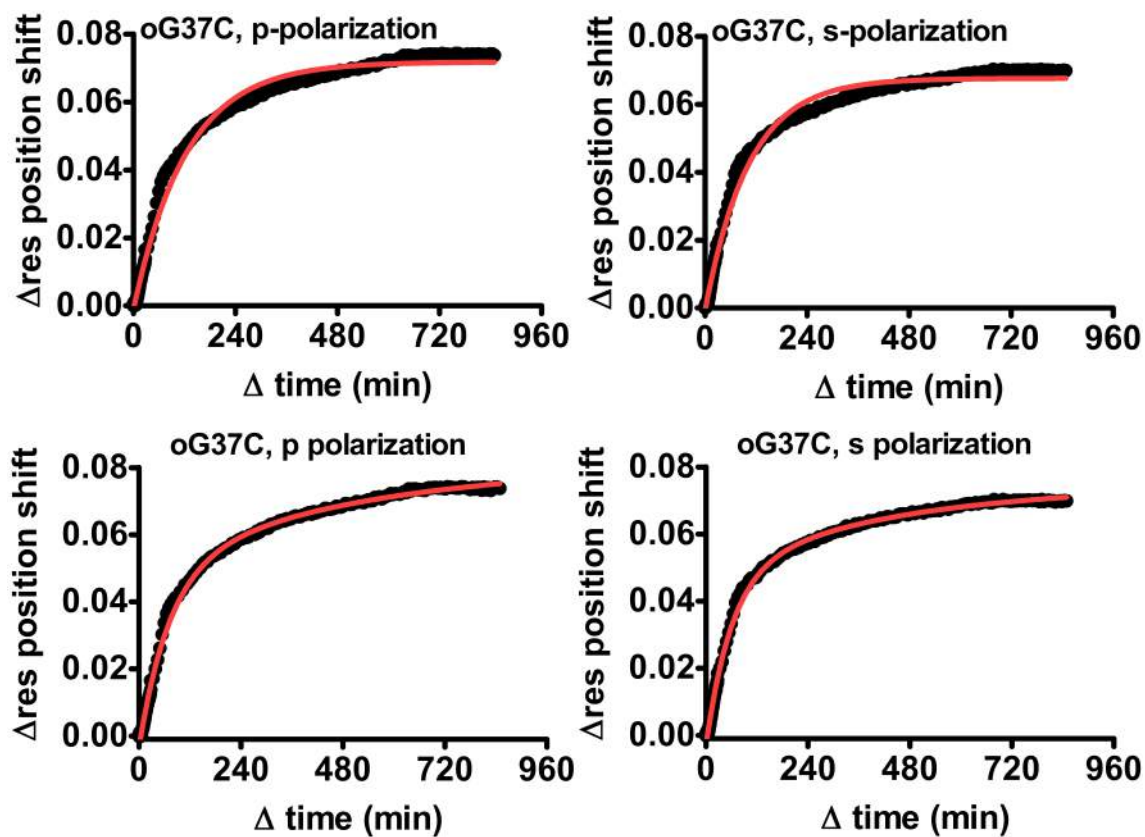


FIGURE 2.11 – Cinétique de l'interaction des peptide oG37C avec une bicouche de DOPG obtenue pas PWR. Évolution de l'angle de résonance obtenu en polarisation -p (à gauche) et -s (à droite) en fonction du temps. Les courbes rouges correspondent à l'ajustement des données cinétiques (courbes pointillées noires) obtenues à partir de l'injection du peptide sur la bicouche de DOPG et jusqu'à ce que l'équilibre du système soit atteint. En haut ajustement par une équation exponentielle à une phase et en bas avec une équation exponentielle à deux phases.

Pour l'oligomère G37C, le meilleur ajustement a été obtenu avec une équation exponentielle à deux phases (fig 2.11). La première étape pourrait correspondre à l'ancrage du peptide comme observé dans le cas des espèces monomériques. La seconde étape, qui semble être spécifique

à l'oligomère G37C, pourrait être due à la réorganisation des lipides à la suite de la liaison de l'oligomère à la membrane. Une telle réorganisation des lipides entraîne la perturbation de l'intégrité membranaire, comme les résultats de fluorescence de la calcéïne l'ont déjà montrés précédemment avec des liposomes de DOPG (éq 2.3).

$$Y = Y_0 + A_{Fast}(1 - e^{-K_{Fast}x}) + A_{Slow}(1 - e^{-K_{Slow}x}) \quad (2.3)$$

Avec :

$$A_{Fast} = (Y_{Plateau} - Y_0) * B * 0.01$$

$$A_{Slow} = (Y_{Plateau} - Y_0)(100 - B) * 0.01$$

$Y_0$  correspond à la valeur en Y au temps  $t = 0$ .  $Y_{Plateau}$  est la valeur en Y pour  $t = \infty$ . B correspond à la fraction de la période (entre  $Y_0$  et le plateau) représentant la plus rapide des deux composantes.  $K_{Fast}$  et  $K_{Slow}$  sont les deux constantes de vitesse exprimées en  $min^{-1}$ .

Les valeurs des constantes cinétiques relatives d'accumulation obtenues avec les différents modèles sont reportées dans le tableau 2.5.

Constantes de cinétique d'accumulation ( $min^{-1}$ )				
	L34T	WT	mG37C	oG37C
k1	0.0165	0.0033	0.0040	0.0015
	$\pm 910^{-3}$	$\pm 710^{-4}$	$\pm 810^{-4}$	$\pm 510^{-5}$
k2				0.002
				$\pm 610^{-4}$

TABLE 2.5 – Constantes de cinétique d'accumulation d'A $\beta_{1-42}$  (WT) et mutants sur des bicouches supportées de DOPG obtenues par ajustement de la variation des angles de résonance de PWR avec des équations exponentielles d'ordre 1 (k1) ou d'ordre 2 (k1, k2).

Avec les membranes zwitterioniques (DOPC), un décalage positif du minimum de résonance a été observé pour chaque polarisation mais une fois la cellule PWR rincée après 20h d'incubation, tout le signal correspondant à l'accumulation des peptides disparaît (fig 2.12).

Ce type de comportement est caractéristique d'une interaction non-spécifique entre les peptides et la bicouche. Le signal résiduel après rinçage (décalage légèrement positif par rapport au signal du minimum de résonance de la bicouche) est considéré comme étant négligeable (fig 2.12). Les résultats montrent une faible affinité des peptides pour les membranes zwitterioniques de DOPC ce qui est en accord avec les résultats obtenus en fluorescence (détection de la calcéïne libérée).

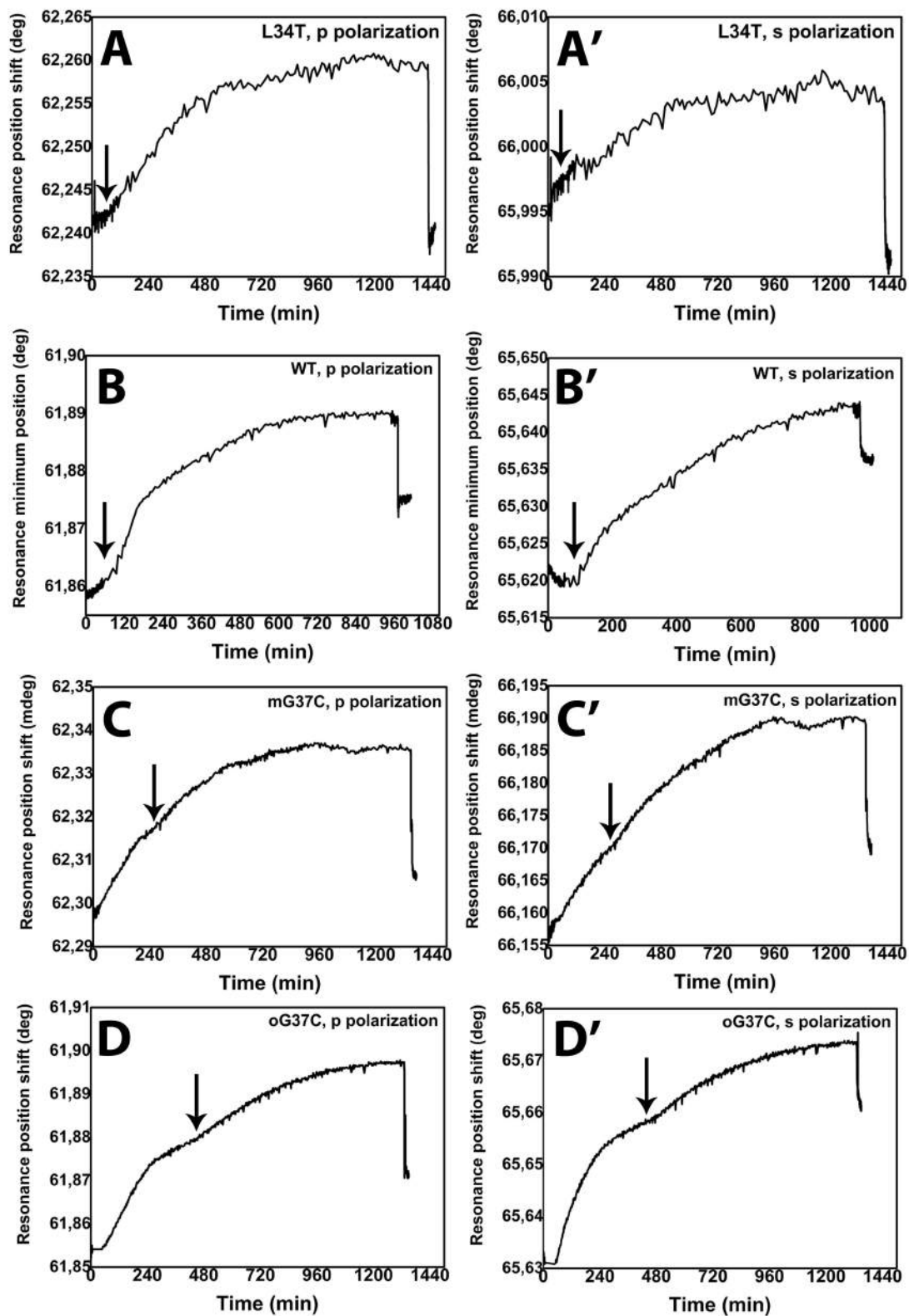


FIGURE 2.12 – Variation des angles de résonance lors de l'interaction de bicouche supportée de DOPC avec les différents peptides L34T, WT, mG37C et oG37C respectivement en polarisation  $-p$  (A, B, C et D) et en polarisation  $-s$  (A', B', C', et D'). Les peptides ont été injectés à une concentration finale de 5  $\mu$ M. Les flèches noires correspondent au temps d'injection des peptides.

### 2.3.2.3 Discussion

L'ensemble de ces résultats démontrent que les espèces A $\beta_{1-42}$ , L34T et mG37C interagissent spécifiquement avec les membranes de DOPG et indiquent que l'isoforme oligomérique (oG37C) provoque de manière plus efficace leur réorganisation. De plus, nous avons pu déterminer que les monomères (WT, L34T et mG37C) s'associent à la membrane avec une cinétique d'association en une phase (ordre 1) alors que l'oligomère G37C interagit avec les bicouches anioniques en deux phases (cinétique d'ordre 2).

Ces dernières années, un modèle de toxicité des amyloïdes basé sur des mutants toxiques du prion Het's *Podospora Anserina* a été développé dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* en collaboration avec l'équipe du professeur Cullin [180] [181]. Cette étude a montré que le peptide WT d'Het's se lie à la membrane sous forme de fibres isolées sans agrégation ni perturbation de la membrane. Il a été établi que le mutant toxique d'Het's (M8) interagit avec les lipides anioniques qui favorisent son agrégation et la formation de microdomaines ("raft-amyloïde") menant à d'importantes perturbations des membranes [179] [182]. Des décalages angulaires similaires à M8 [183] ont été observés en PWR pour l'oligomère G37C en interaction avec les lipides anioniques DOPG. Des constantes de vitesse similaires et des augmentations de l'épaisseur des membranes de PG proches ont été déterminées [183]. Si on compare les deux amyloïdes, il semble que les mutants toxiques (M8 et oG37C) interagissent fortement avec les membranes anioniques DOPG induisant la réorganisation de la membrane. En effet, alors que les monomères WT, L34T et mG37C interagissent avec la membrane en un processus en une phase, l'interaction de l'oligomère G37C se fait en deux phases : il s'accroche tout d'abord à la membrane induisant ensuite une réorganisation.

### 2.3.3 Influence des lipides sur l'auto-assemblage d'A $\beta_{1-42}$

Afin de mettre en évidence l'impact des lipides sur le processus d'auto-assemblage des peptides d'A $\beta$ , des mesures de fluorescence de la Thioflavine T ont été effectuées.

#### 2.3.3.1 Fluorescence de la Thioflavine T

##### 2.3.3.1.1 La Thioflavine

La thioflavine T (ThT) révèle de manière caractéristique les dépôts de type amyloïde dans de nombreuses conditions pathophysiologiques [184]. Comme le rouge Congo, la ThT est connue pour interagir spécifiquement avec la structure "*cross-beta*"; structure commune à tous les amyloïdes, correspondant à une forme agrégée. L'ajout de ce composé à une solution contenant des espèces amyloïdes mène à une augmentation de l'émission de fluorescence à 480 nm. Les courbes obtenues en fonction du temps, de forme sigmoïdale, correspondent à la cinétique d'auto-assemblage des amyloïdes avec une première phase de nucléation suivit par une croissance exponentielle [185]. Pour nos expériences, 20  $\mu$ M de ThT ont été ajouté à une solution contenant des liposomes et les différents mutants d'A $\beta_{1-42}$ .

### 2.3.3.2 Résultats

Le processus d'auto-assemblage peut être modulé par différents facteurs, en particulier par la présence de lipides. Le fluorophore thioflavine T (appelé ThT par la suite) a été utilisé pour détecter la formation de fibres amyloïdes à partir de peptides seuls ou en présence de liposomes anioniques (DOPG) ou zwitterioniques (DOPC). Sans lipides, les peptides WT, L34T et mG37C adoptent tous la forme d'une courbe sigmoïdale caractéristique de la formation de fibres amyloïdes (figures 2.13 et 2.14, courbes noires). Après une phase de latence (correspondant à la formation de noyaux amyloïdes) une augmentation exponentielle de la fluorescence est observée jusqu'à ce qu'un plateau soit atteint.

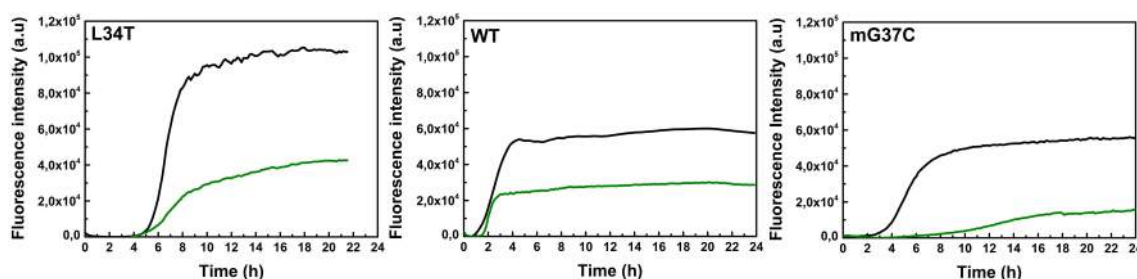


FIGURE 2.13 – Intensité de la fluorescence de la Thioflavine T révélant la formation de fibres des peptides L34T, WT et mG37C sans lipides (courbes noires) et en présence de liposomes de DOPG (courbes vertes). Les peptides à 20  $\mu$ M ont été incubés avec 400  $\mu$ M de liposomes de DOPG (Ri20).

En accord avec les résultats obtenus précédemment, l'oligomère G37C ne forme pas de longues fibres, ce qui est confirmé par une très faible augmentation de la fluorescence (figure 2.14) [5].

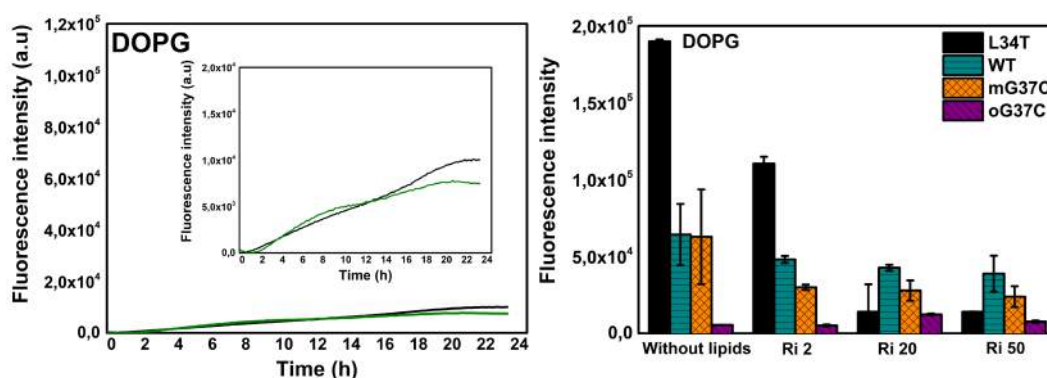


FIGURE 2.14 – A gauche : intensité de la fluorescence de la Thioflavine T en présence d'oG37C sans lipides (courbes noires) et en présence de liposomes DOPG (courbes vertes). Le peptide à 20  $\mu$ M a été incubé avec 400  $\mu$ M de liposomes (Ri20). A droite : maximum fluorescence de ThT détecté après 24h d'incubation à 25°C des peptides L34T ( noir), WT (cyan), mG37C (orange) et oG37C (violet) en présence de liposomes de DOPG (à gauche) à différents ratios lipide/peptide (Ri). La concentration des peptides était fixée à 20  $\mu$ M et la concentration des lipides variait de 0.04 à 1 mM.

Lorsque les peptides sont incubés avec des liposomes de DOPG au ratio lipide/peptide le plus élevé (Ri2), la fluorescence de la ThT diminue de manière significative (figure 2.13, courbes vertes). Les temps de latence avec et sans liposomes sont similaires pour WT et L34T mais

la diminution de fluorescence de la ThT montre que la quantité finale de fibres formées est moins importante. La capacité du monomère G37C à s'auto-assembler et à former des fibres est considérablement diminuée en présence de lipides anioniques. La courbe de cinétique de liaison de la ThT diminue et la valeur au plateau est atteinte avec un intervalle de 10h comparé à la même expérience en absence de lipides. Sur la figure 2.14, sont représentées les valeurs de fluorescence au plateau après 24h d'incubation des liposomes DOPG avec les différents peptides pour les ratios lipide/peptide Ri2, Ri20 et Ri50. Le comportement observé aux ratio Ri20 et Ri50 est en accord avec ceux analysés à Ri2.

Les expériences menées dans les mêmes conditions mais en présence de liposomes zwitterioniques DOPC montrent que l'auto-assemblage des peptides L34T et WT n'est pas ou peu impacté par ce type de lipides (figure 2.15). La présence de lipides zwitterioniques DOPC modifie légèrement la cinétique d'auto-assemblage des peptides mais n'influe pas sur le taux de fibres. Ces mesures corroborent celles obtenues précédemment ne montrant aucun impact des peptides sur l'intégrité membranaire de liposomes de DOPC et pas d'affinité spécifique pour les bicouches zwitterioniques.

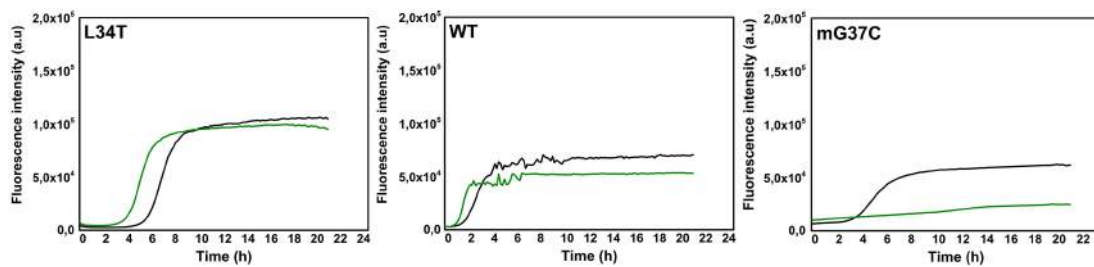


FIGURE 2.15 – Intensité de la fluorescence de la Thioflavine T révélant la formation de fibres des peptides L34T, WT et mG37C sans lipides (courbes noires) et en présence de liposome de DOPC (courbes vertes). Les peptides à 20  $\mu$ M ont été incubés avec 400  $\mu$ M de liposome de DOPC (Ri20).

On note une diminution de la formation de fibres liée à la diminution de l'intensité de fluorescence en présence de liposomes anioniques et pas d'impact des vésicules zwitterioniques sur la fibrillation des peptides WT et L34T.

En présence de liposomes zwitterioniques (DOPC) les mutants G37C ont un comportement différent des autres peptides. Ils induisent les mêmes effets qu'en présence de liposomes anioniques (DOPG).

Comme observé avec les liposomes DOPG, les intensités de fluorescence mesurées pour l'oligomère G37C restent inchangées en présence de liposomes DOPC (fig 2.16). Ceci s'explique par le fait que ces oligomères sont un état d'auto-assemblage stable dans le temps, ne formant jamais de grandes fibres.

Pour le monomère G37C, en présence de DOPC, la fluorescence de la ThT est fortement diminuée et le temps de latence largement allongé. Ces résultats semblent montrer que le monomère favorise l'interaction avec les lipides à la formation d'espèces agrégées et ce quelque soit le lipide. Contrairement aux expériences précédentes le monomère G37C en présence de lipides semble former uniquement de petits oligomères se comportant comme l'oligomère G37C.



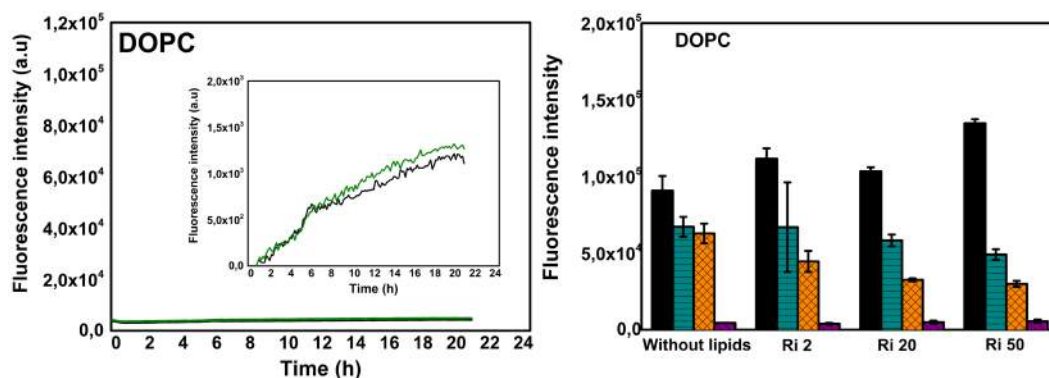


FIGURE 2.16 – A gauche : intensité de la fluorescence de la Thioflavine T en présence de oG37C sans lipides (courbes noires) et en présence de liposomes DOPC (courbes vertes). Le peptide à 20  $\mu\text{M}$  a été incubé avec 400  $\mu\text{M}$  de liposomes (Ri20). A droite : maximum fluorescence de ThT détecté après 24h d'incubation à 25°C des peptides L34T ( noir), WT (cyan), mG37C (orange) et oG37C (violet) en présence de liposomes de DOPC (à gauche) à différents ratios lipide/peptide (Ri). La concentration des peptides était fixée à 20  $\mu\text{M}$  et la concentration des lipides variait de 0.04 à 1 mM.

Ces derniers résultats nous paraissent étranges au vu des précédents résultats obtenus avec les expériences de fluorescence de la calcéïne et de PWR. En effet alors qu'aucune interaction n'avaient été observée en présence de lipides zwitterioniques (pas d'interaction spécifique), les mesures de fluorescence de la ThT montrent que le monomère G37C s'auto-assemble moins et interagit avec les liposomes DOPC. Nous n'avons actuellement aucune explication logique à ce phénomène.

### 2.3.3.3 Discussion

Les résultats obtenus ont montrés que les membranes anioniques inhibent la formation de fibres.

Dans la littérature, dans le cas de l' $\alpha$ -synucléïne [145], IAPP [147] ou  $A\beta_{1-40}$  [140], la présence de lipides négativement chargés accélère la croissance des fibres en environnement membranaire comparé à la fibrillation en solution. En revanche, les liposomes composés de lipides zwitterioniques semblent ralentir le processus d'auto-assemblage d' $A\beta$  [148]. Dans notre étude, l'élément moteur de l'interaction d' $A\beta_{1-42}$  et ses mutants avec les membranes est différent ce qui pourrait expliquer leurs comportements particuliers.

Sciaccia et al [16], ont démontré qu' $A\beta_{1-40}$  interagit avec les membranes en formant des pores conduisant dans un second temps à une fragmentation non spécifique de la membrane lipidique durant la formation d'amyloïdes. Nos données de ThT démontrent que les lipides anioniques DOPG inhibent le processus de fibrillation. On peut donc conclure que contrairement à l'étude menée par Sciaccia sur  $A\beta_{1-40}$ , dans le cas d' $A\beta_{1-42}$ , la fragmentation de la membrane ne peut pas être due à la formation de fibres.

D'après les résultats obtenus nous pouvons établir deux hypothèses concernant la diminution de la fluorescence de la ThT :

- diminution de la quantité de fibres formées

- diminution de la quantité d'espèces monomériques capable de former des fibres car recrutées par la membrane

En effet, ces résultats semblent nous indiquer que l'interaction des peptides avec les liposomes (anioniques) est favorisée par rapport au processus d'auto-assemblage. La cryo-microscopie électronique à transmission a été utilisée par la suite afin de visualiser l'effet des peptides sur l'intégrité des liposomes.

### 2.3.4 Impact d'A $\beta_{1-42}$ sur la morphologie de liposomes anioniques

Les résultats des expériences précédentes nous ont montré que le peptide A $\beta_{1-42}$  et les mutants avaient un effet seulement sur les lipides anioniques DOPG. Nous avons donc réalisé les analyses de l'effet des différents peptides sur la morphologie de liposomes uniquement en présence de liposomes anioniques DOPG.

#### 2.3.4.1 Principe de la cryo-microscopie électronique à transmission

##### 2.3.4.1.1 La cryo-TEM

La cryo-microscopie électronique à transmission est une technique de choix pour l'observation directe des systèmes biologiques à un temps donné. En effet, les échantillons préparés en solution sont ensuite directement congelés à une température de  $-170^{\circ}\text{C}$  ce qui permet une observation de l'échantillon au temps de congélation sans dénaturation. Pour nos observations les peptides ont été incubés avec des liposomes anioniques et congelés au bout de 2h et 24h.

#### 2.3.4.2 Résultats

La technique de cryo-microscopie électronique à transmission a été utilisée pour suivre les changements morphologiques de liposomes de DOPG sous l'effet de l'interaction avec les quatre peptides (WT, L34T, mG37C et oG37C). Après 2h d'incubation, on observe deux comportements : d'un côté WT et L34T et de l'autre les mutants G37C. Sous l'action des peptides WT et L34T, les liposomes adoptent une forme tubulaire indiquant que les peptides ont la capacité de déformer les liposomes et de modifier la courbure de leur membrane(fig 2.17).

Pour mG37C et oG37C, les images révèlent la présence de larges assemblages oligomériques, appelés agrégats, des fragments de membranes et des liposomes ouverts suggérant que les deux formes, oligomérique et monomérique, perturbent les membranes lipidiques. Contrairement aux images avec L34T et WT, aucun liposome déformé ni tubule ne sont observés. Pour le monomère G37C, on peut noter l'absence de longues fibres en présence de lipides [5]. La présence de lipides empêche la fibrillation des peptides ce qui est en accord avec les résultats de fluorescence de la ThT. Les résultats soulignent le fait que la présence de membrane peut induire un processus de fibrillation différent de celui obtenu en solution : le monomère G37C en contact avec des liposomes anioniques DOPG se comporte comme l'oligomère G37C. Ces résultats suggèrent que les membranes peuvent favoriser la formation d'espèces oligomériques dites "*off-pathway*", telles que l'oligomère G37C, responsables de leur destruction.

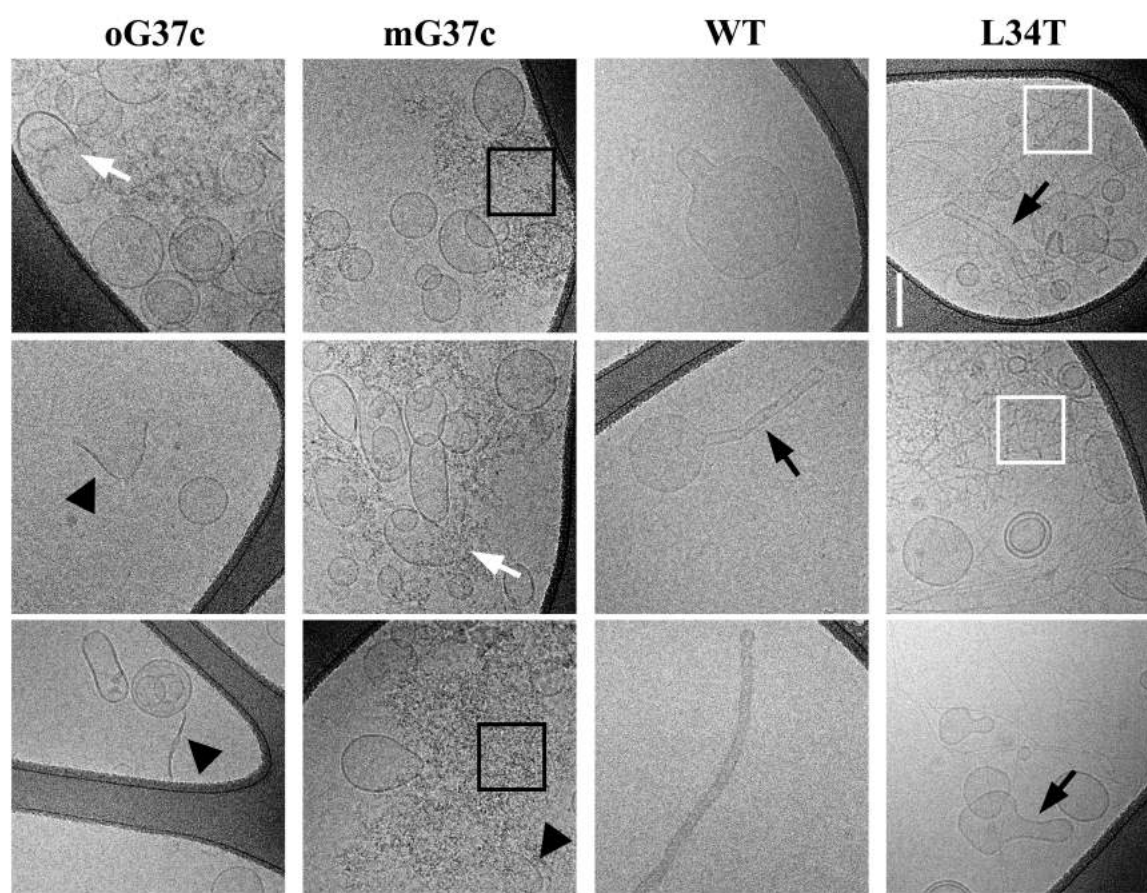


FIGURE 2.17 – Images de cryo-microscopie électronique à balayage des différents types de peptides amyloïdes après 2 heures d'incubation avec des liposomes de DOPG à 25 °C (tampon A). Le ratio lipide/peptide était Ri=2. Les peptides ont été introduits à une concentration de 20  $\mu$ M. Les flèches noires, pointes de flèches et flèches blanches correspondent respectivement aux liposomes avec des formes tubulaires, aux morceaux de membrane et enfin aux vésicules ouvertes. Les cadres blancs signalent la présence de fibres et les cadres noirs d'agrégats. La barre d'échelle représente 100 nm.

Les images obtenues pour L34T, après 24h d'incubation (fig 2.18), montrent uniquement des fibres réparties de manière homogène. Pour les peptides WT et mG37C, on observe la présence de fibres et d'agrégats (respectivement, cadres blancs et noirs). On peut aussi noter que le WT forme apparemment plus de fibres que d'agrégats alors que le monomère G37C adopte la tendance inverse formant plus d'agrégats que de fibres. On peut aussi noter que, pour ces trois peptides (L34T, WT et mG37C), même si quelques liposomes présentent une forme tubulaire, la plupart d'entre-eux sont intacts ce qui est cohérent avec l'absence de perturbations par des assemblages peptidiques plus importants tels que les fibres ou les agrégats amorphes. L'oligomère G37C quand à lui adopte un autre comportement, semblable à celui qui avait été observé après 2h d'incubation pour les monomères. On peut toujours observer quelques liposomes ouverts et des fragments de membrane mais en très faible quantité comparé à l'échantillon après 2h d'incubation. Cependant, les liposomes restant sont très déformés et certains ont formé des tubules. L'échantillon est composé de liposomes résiduels intacts, qui sont environ cinq fois plus gros que les liposomes d'origine, de vésicules ouvertes, de tubules et de morceaux de membrane. Aucune fibre n'a été

observée mais de petits agrégats couvrent de grandes surfaces.

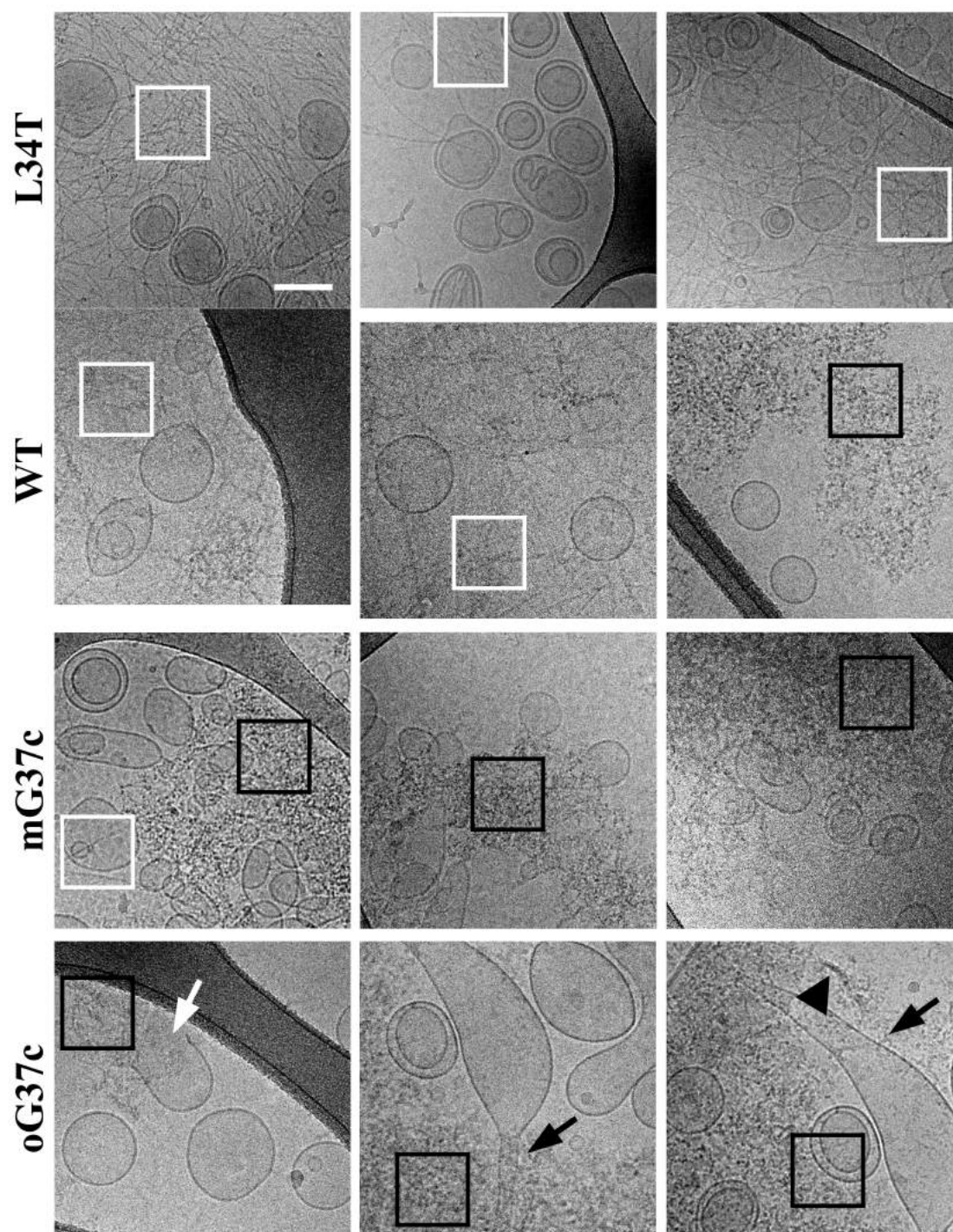


FIGURE 2.18 – Images de cryo-microscopie électronique à balayage des différents types de peptides amyloïdes après 24 heures d'incubation avec des liposomes de DOPG à 25 °C dans un tampon Tris (pH 7,4). Le ratio lipide/peptide était  $R_i=2$ . Les peptides ont été introduits à une concentration de 20  $\mu\text{M}$ . Les flèches noires, pointes de flèches et flèches blanches correspondent respectivement aux liposomes avec des formes tubulaires, aux morceaux de membrane et enfin aux vésicules ouvertes. Les cadres blancs signalent les fibres et les cadres noirs les agrégats. La barre d'échelle représente 100 nm.

### 2.3.4.3 Discussion

Les résultats obtenus avec la technique de cryo-microscopie électronique à transmission montrent que les peptides perturbent les liposomes différemment en fonction de leur état d'agrégation. Au bout de 2h d'interaction le mutant G37C induit une forte perturbation quelque soit son état (oligomère ou monomère) menant à l'apparente solubilisation des liposomes. Les espèces (L34T et WT) présentent un effet sur la courbure et la taille des liposomes. Au bout de 24h d'interaction, les images montrent la population de liposomes restant après interaction. On peut supposer qu'à ce temps, les vésicules très déformées se sont éclatées et que les liposomes qui semblent intacts correspondent aux liposomes originellement non impactés par les peptides. En revanche, l'oligomère G37C induit une destruction et/ou une forte déformation des liposomes.

On peut observer que le monomère G37C suit dans un premier temps le même comportement que l'oligomère G37C pour finalement adopter un comportement similaire aux monomères L34T et WT. Ce changement peut s'expliquer par une différenciation de chemin d'auto-assemblage.

On peut penser que le monomère G37C en interaction avec des lipides anioniques s'engage dans deux processus d'auto-assemblage à la fois : la formation d'espèces oligomériques qui interagissent avec les membrane et l'auto-assemblage menant à la formation de fibres. Il semblerait qu'à court terme (2h) le processus majoritaire soit celui de la formation des oligomères, alors que sur le long terme (24h), c'est la formation de fibres qui est favorisée.

L'oligomère G37C en revanche est une espèce stable dans sa conformation oligomérique, il continue donc de perturber les membranes au bout de 24h. Les monomères L34T et WT ne forment que très peu d'oligomères et sont largement engagés dans le chemin d'agrégation menant à la formation de fibres.

De manière intéressante, la toxicité mesurée *in vivo* est corrélée avec la capacité d'interaction des peptides et des liposomes anioniques (DOPG) mesurée *in vitro*.

Les résultats obtenus nous ont permis de confirmer que les fibres n'interagissent pas avec les liposomes anioniques. Les fibres semblent recouvrir les liposomes de manière désorganisée qu'ils soient déformés ou non. Aucune fibre ancrée dans des liposomes n'a pu être observée, suggérant que la fibrillation des peptides A $\beta_{1-42}$  solubles se passe au même moment que l'interaction et indépendamment de la présence de liposomes. Les fibres formées ne modifient pas la structure des liposomes ce qui est en accord avec le fait que les fibres seules ne sont pas responsable de la perméabilisation de la membrane. La modification de la courbure des membranes est indépendant de la croissance des fibres, contrairement à ce qui a été démontré pour l'effet du peptide hIAPP sur des liposomes [186]. Il n'existe apparemment pas de mécanisme commun d'interaction avec des membranes entre A $\beta$  et hIAPP. De plus, le fait que la surface soit recouverte par des agrégats concorde avec la diminution de fluorescence observée en ThT : les peptides s'auto-assemblent moins en présence de lipides anioniques DOPG.

### 2.3.5 Conclusions

L'objectif des travaux exposés dans ce chapitre était de comprendre l'interaction entre des mutants du peptide A $\beta_{1-42}$  (WT, L34T, mG37C et oG37C) et deux modèles lipidiques simples : anionique ou zwitterionique. Les résultats obtenus nous ont permis de mettre en évidence une interaction spécifique avec les lipides anioniques DOPG entraînant une forte perturbation de la membrane.

Nous avons pu établir une corrélation directe entre la toxicité des peptides d'A $\beta$  établie *in vivo* dans la levure et leur capacité à perturber les membranes. Dans le processus d'interaction, de petits agrégats (petits assemblages oligomériques) sont formés plutôt que des fibres. Les oligomères toxiques sont formés indépendamment du processus d'auto-assemblage ce qui a été caractérisé précédemment comme une fibrillation "*off-pathway*". La formation de ces oligomères pourrait être induite par la présence de groupements OH à la surface des membranes.

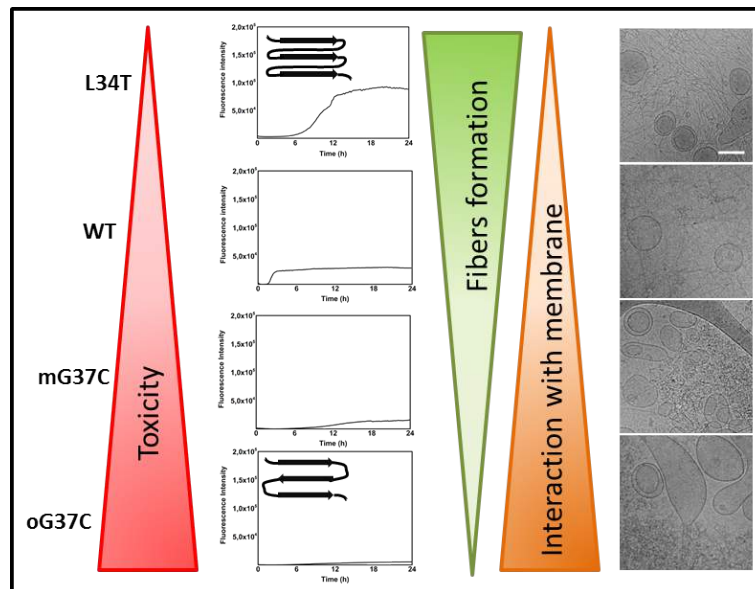


FIGURE 2.19 – Synthèse des résultats obtenus : le peptide présentant la plus forte toxicité *in vivo* (oG37C) ne forme pas de fibre et montre la plus forte interaction avec les membranes anioniques induisant leur destruction, pour les peptides moins toxiques on observe le schéma inverse.

#### MESSAGE A RETENIR

- Le mécanisme d'interaction entre les peptides A $\beta_{1-42}$  et les membranes n'est pas régi par les interactions électrostatiques
- Interaction favorisée par la présence des têtes polaires de PG
- Les groupements -OH présents à la surface des lipides DOPG semblent être à l'origine de l'interaction d'A $\beta_{1-42}$  avec les membranes
- A $\beta_{1-42}$  et mutants induisent tous la perméation des liposomes anioniques DOPG
- Oligomère G37C provoque la rupture des membranes anioniques
- La présence de lipides anioniques modifie le processus d'auto-assemblage des peptides d'A $\beta_{1-42}$



## Chapitre 3

### Structure et morphologie d'A $\beta$ en interaction avec des membranes





## 3.1 Introduction

Les résultats de l'étude précédente ont mis en évidence la forte perturbation de liposomes de DOPG par des espèces oligomériques.

Les techniques usuelles de caractérisation de structures secondaires comme l'ATR-FTIR, donne une réponse moyenne de toutes les structures présentes au sein de l'échantillon. Le peptide  $A\beta_{1-42}$  présente un grand polymorphisme en solution. Il nous a semblé opportun d'utiliser une méthode de caractérisation capable de déterminer la morphologie et la structure à l'échelle de la fibre unique [187] [188].

On trouve dans la littérature l'idée largement répandue du rôle clé que joueraient les gangliosides, constituants des membranes des cellules du système nerveux, et particulièrement du GM1 dans l'interaction des amyloïdes avec les membranes des neurones [189] [190] [191]. GM1 contient un chaînon oligosaccharidique de quatre sucres plus un acide sialique et donc de nombreux groupements -OH éléments principaux de notre hypothèse suite aux expériences menées précédemment. On rapporte aussi l'importance du cholestérol qui, selon sa concentration dans les membranes, pourrait inhiber ou favoriser cette interaction [127] [192]. Le cholestérol, les gangliosides GM1 et la sphingomyéline sont des composants essentiels des membranes cellulaires jouant un rôle important dans le développement, la prolifération, la différenciation et la maintenance des tissus neuronaux et des cellules. Ensemble, ils sont capables de former des microdomaines lipidiques caractéristiques agissant en tant que cible pour les peptides [190] [193] [134]. De plus certains auteurs proposent un rôle collaboratif du GM1 et du cholestérol l'un servant à l'ancrage d' $A\beta$  à la membrane et l'autre permettant l'interaction des peptides avec celle-ci menant à sa destruction [127] [194].

L'objectif de ces travaux est d'évaluer les interactions des peptides  $A\beta_{1-42}$  (WT et mutants) avec des modèles membranaires comprenant les lipides POPC, les gangliosides GM1, de la sphingomyéline et du cholestérol. Nous avons donc testé trois compositions lipidiques : GM1/Chol/SM/PC (40/20/20/20), GM1/SM/PC (40/20/40) afin d'étudier l'importance des GM1, Chol/SM/PC (20/20/60) qui nous indiquera le rôle du cholestérol et enfin SM/PC (20/80). La nano-spectroscopie infrarouge connue sous le nom de *nano-IR* permet d'accéder à la morphologie, la structure d'objets à l'échelle nanométrique [187] [188].

## 3.2 Structure d' $A\beta$ en interaction avec des modèles membranaires constitués de GM1, Chol, SM et POPC

### 3.2.1 Principe du nano-Infra Rouge

Cette technique, par le biais d'une pointe AFM, détecte l'expansion thermique d'un échantillon sous l'action d'un faisceau infrarouge qui est corrélée à son spectre d'absorption (voir détails en annexes) [187] [188]. Le nanoIR permet d'obtenir une image de la morphologie de l'échantillon puis un spectre infrarouge de la zone sondée avec une résolution nanométrique. Le nano-IR permet aussi d'effectuer des cartographies infrarouges de la zone de balayage, à une

longueur d'onde donnée, et d'obtenir la distribution spatiale des éléments d'intérêt. Grâce à une collaboration avec l'équipe du professeur Molinari du Laboratoire de Recherche en Nanoscience (LRN) à Reims, nous avons pu tester nos modèles d'interaction d'A $\beta$  avec des couches lipidiques avec l'appareil *nanoIR1* commercialisé par *Anasys*.

## 3.2.2 Résultats et discussion

Nous avons dans un premier temps étudié la morphologie et la structure des fibres matures, d'A $\beta_{1-42}$  et des mutants, seules puis l'interaction des peptides monomères et oligomères avec des modèles membranaires.

### 3.2.2.1 Morphologies et structures des fibres d'A $\beta_{1-42}$

A notre connaissance, il existe peu d'étude de peptides amyloïdes [195] [196] et aucune concernant l'étude d'A $\beta_{1-42}$  avec la technique du nanoIR. Nous avons donc commencé notre étude par l'observation de fibres d'A $\beta_{1-42}$  (WT) (fig 3.1) et mutants (L34T, mG37C et oG37C). Les peptides ont été dans un premier temps observés après 20 jours d'incubation à 37°C sous agitation, 20  $\mu$ L de solution de fibres à 20  $\mu$ M a été déposée sur un prisme de ZnSe et laissé sécher à température ambiante jusqu'à évaporation totale du tampon.

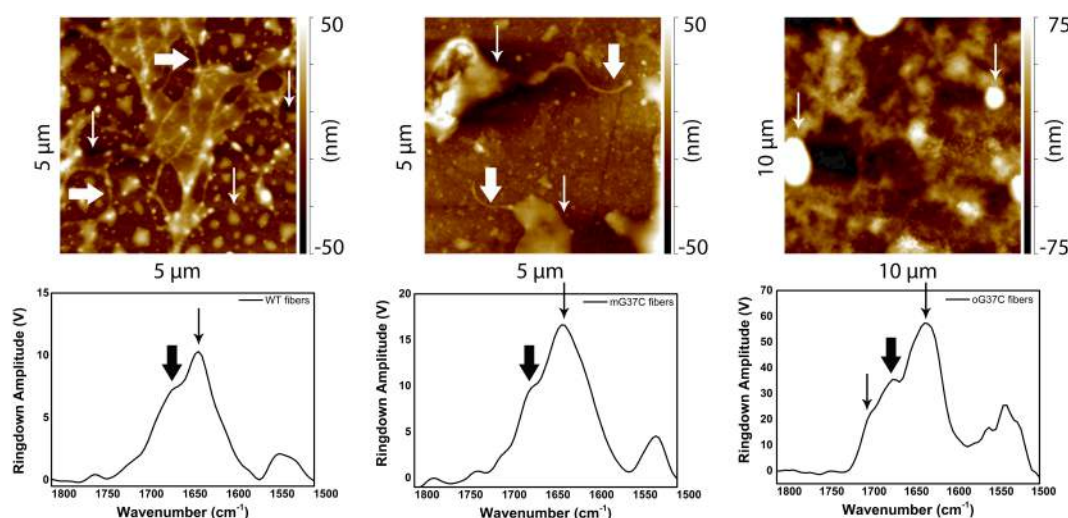


FIGURE 3.1 – Images AFM topographiques  $5 \times 5 \mu\text{m}$  (haut) de la surface d'une couche mince de fibres (20  $\mu\text{M}$ ) des différents peptides WT (à gauche), mG37C (au centre), oG37C (à droite) déposés à la surface d'un prisme ZnSe. Les fines flèches blanches correspondent aux agrégats amorphes et les larges flèches blanches indiquent les fibres formées. Spectres IR correspondant (bas) avec les petites flèches noires indiquant les bandes correspondant à la structure en feuillets- $\beta$  et les larges flèches noires indiquant la contribution de structure en coudes- $\beta$ .

Les images AFM révèlent des morphologies différentes selon le peptide observé (fig 3.1). L'oligomère oG37C qui ne forme pas de longues fibres apparaît comme de petits agrégats sphériques. Aucune fibre n'a été observée comme attendu. En revanche, sur les échantillons correspondant aux monomères on observe des fibres. Nous avons constaté que le monomère WT forme plus de fibres que le monomère G37C, ces fibres sont co-localisées avec des agrégats amorphes. Le

monomère G37C semble favoriser la formation d'agrégats amorphes et les quelques fibres que nous avons observées paraissent ancrées aux agrégats. Nous pouvons avancer l'hypothèse que ces agrégats agissent comme des réservoirs d'espèces plus petites (monomères ou espèces intermédiaires) capables de former des fibres. On trouve dans la littérature l'idée que les agrégats amyloïdes formés *in vivo*, eux-même bénins, pourraient avoir un rôle protecteur en séquestrant les espèces oligomériques toxiques ou au contraire agir comme un réservoir capable de libérer progressivement les espèces toxiques [197] [198] [199]. L'oligomère G37C forme des gros objets sphériques très épais (environ 150 nm) et amorphes entourés par ce qui semble être des amas d'assemblages sphériques de petite taille (environ 100 nm). Grâce au logiciel (Studio Analysis) fournis par *Anasys* qui commercialise l'appareil, il a été possible de déterminer l'épaisseur des fibres formées. Pour les monomères WT et mG37C, les profils mesurés montrent une épaisseur moyenne autour de 10 nm ce qui est en accord avec d'autres études [200].

En parallèle de l'acquisition des images, des spectres infrarouges ont été acquis par conversion de l'amplitude mesurée par la pointe AFM, liée à l'expansion thermique de l'échantillon sous l'effet du faisceau laser IR (fig 3.1).

A cause de la faible épaisseur des fibres, il n'est pas possible d'enregistrer les spectres IR sur les zones présentées sur les images AFM (fig 3.1). Avec le module utilisé pour ces mesures, le constructeur préconise une épaisseur minimale 100 nm pour l'acquisition de spectres infrarouges [187] [201]. Néanmoins, cette valeur peut être modulée en fonction de l'absorption à une longueur d'onde donnée de l'échantillon : si l'échantillon absorbe beaucoup résultant en une forte dilatation, l'épaisseur nécessaire peut être diminuée. Dans notre cas, les fibres formées possèdent une épaisseur de l'ordre de la dizaine de nanomètre et cette épaisseur s'est révélée insuffisante pour l'acquisition de spectres IR à l'échelle de la fibre unique. Nos mesures ont donc été effectuées sur des zones plus épaisses correspondant à un empilement désorganisé de fibres d'une épaisseur supérieure à 100 nm (fig 3.2).

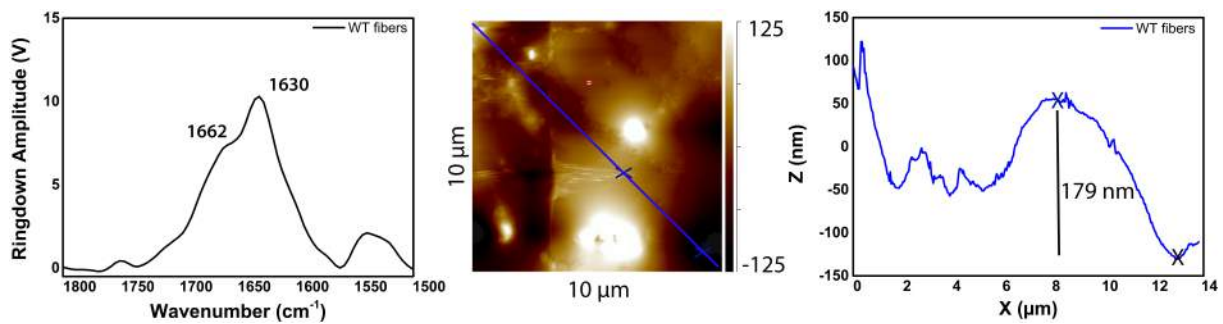


FIGURE 3.2 – Spectre IR de la zone amide entre 1800 et 1500 cm<sup>-1</sup> (gauche), image AFM topographique 10×10 μm (milieu) et coupe transversale (droite) d'une zone épaisse de l'échantillon WT après 20 jours d'incubation à 37°C sous agitation.

Dans le cas présent nous avons effectué l'enregistrement du spectre entre 1800 et 1500 cm<sup>-1</sup>, zone correspondant aux bandes amides I et amide II caractéristiques des protéines (fig 3.1). Les spectres montrent que les monomères WT et mG37C adoptent une structure secondaire majoritairement en feuillets- $\beta$  parallèles (bande majoritaire à 1631 cm<sup>-1</sup>, fines flèches noires) avec une contribution minoritaire de structure en coude  $\beta$  (larges flèches noires) alors que l'oligomère

G37C se structure en feuillets- $\beta$  anti-parallèles avec les bandes caractéristiques à 1625 et 1689  $\text{cm}^{-1}$  (petites flèches noires). Le profil des bandes obtenues et des épaulements, correspondant à la structure en feuillets- $\beta$  parallèles et antiparallèles, correspond à ce qui a été récemment observé par Ruggeri *et al* lors de l'étude d'un amyloïde (le domaine Josephin de l'ataxin-3) [196]. Les résultats obtenus correspondent aux spectres attendus et mesurés précédemment pour le peptide en solution en ATR-FTIR [5]. On retrouve des spectres équivalents sur toutes les zones épaisses, mais elle ne permettent pas d'identifier la morphologie des fibres et correspondent en réalité à la moyenne du signal sur toute l'épaisseur, on retrouve donc des données similaires à celles obtenues en ATR-FTIR.

De récentes avancées technologiques permettent désormais d'obtenir des spectres infrarouges avec le nanoIR pour des épaisseurs d'échantillon d'environ 20 nm [202] mais nous n'étions pas en possession de tels modules.

### 3.2.2.2 Interaction d'A $\beta_{1-42}$ -WT et du mutant G37C avec des membranes modèles

#### 3.2.2.2.1 Formation et observation des dépôts lipidiques

Aucuns travaux sur l'étude de l'interaction de protéines avec des couches lipidiques par nanoIR n'est à notre connaissance rapportée dans la littérature. Plusieurs approches, basées sur la littérature [203] [204], ont donc été testées dans le but d'obtenir des bicouches bien organisées. Ces protocoles sont inspirés de ceux utilisés en ATR-FTIR par le dépôt de bicouche lipidique à la surface du prisme par éclatement de SUV. L'éclatement sur le prisme de ZnSe du nanoIR n'a pas permis d'obtenir l'enregistrement d'un spectre infrarouge des bandes de vibration des  $\text{CH}_2$  des lipides organisés dans une bicouche supportée. Les problèmes rencontrés sont attribués à la formation d'une couche lipidique trop fine (environ 4 nm pour une bicouche [205]) pour détecter son expansion thermique par cette technique. Finalement, 10  $\mu\text{L}$  d'une solution de liposomes (LUV) à 1,5  $\text{mg.ml}^{-1}$  a été déposée sur la surface du prisme et laissée à température ambiante jusqu'à séchage complet. Ce protocole nous a permis d'obtenir la morphologie (fig 3.3) et des spectres pour les trois compositions lipidique souhaitées, GM1/Chol/SM/PC (40/20/20/20), SM/PC (20/80) et Chol/SM/PC (20/20/60) (fig 3.5 et 3.6).

Les images AFM (fig 3.3) montrent que la couche GM1/Chol/SM/PC est composée de larges domaines entourés par des lacunes. Pour les couches Chol/SM/PC et SM/PC on observe des morphologies similaires avec des domaines sphériques d'une largeur d'environ 200 nm. Une étude précédente menée en AFM sur des membranes contenant de la sphingomyéline, du Cholestérol, des GM1 et du DOPC montre qu'il y a une séparation de phase entre des domaines riches en SM/Cholesterol dans une matrice de DOPC et que le GM1 est distribué de manière hétérogène en îlots d'une taille submicronique dans des domaines plus larges de SM/Cholestérol [206]. Les images obtenues pour SM/PC et Chol/SM/PC sont similaires à ce que nous avons observé avec des séparations de phase et la formation de nombreux domaines sphériques.

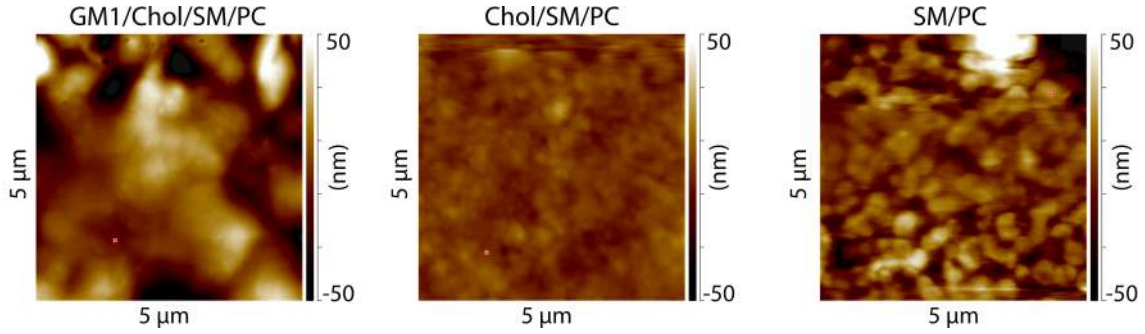


FIGURE 3.3 – Images AFM topographiques 5×5  $\mu\text{m}$  des différentes couches lipidiques GM1/Chol/SM/PC (à gauche), Chol/SM/PC (au milieu) et SM/PC (à droite).

Des mesures ont été effectuées dans le but de déterminer une épaisseur moyenne pour chaque type de bicouche (fig 3.4) et de pouvoir conclure sur le nombre de bicouche en présence avec la connaissance de l'épaisseur théorique d'une bicouche (environ 4 nm [205]). Nous avons mesuré une épaisseur moyenne de l'ordre de 500 nm pour chaque bicouche. Cette importante épaisseur peut s'expliquer par le protocole utilisé pour former les dépôts et obtenir un signal infrarouge correct. Les couches lipidiques formées sont très épaisses et on remarque des variations importantes de l'épaisseur selon les zones sondées. Ces variations peuvent s'expliquer par l'hétérogénéité de la taille des liposomes formés en solution.

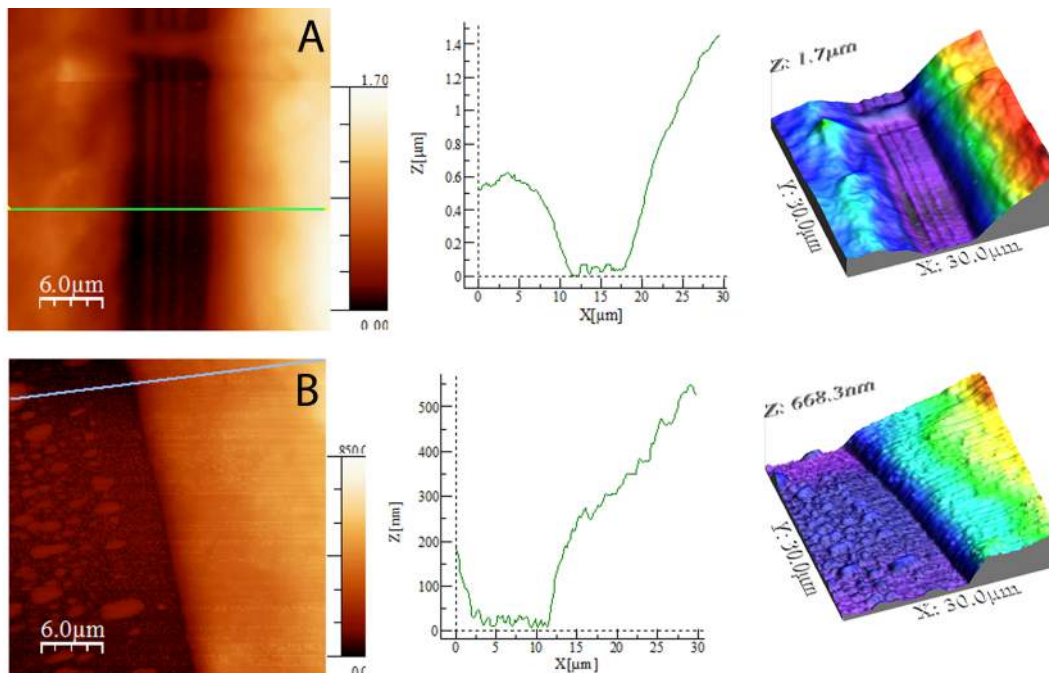


FIGURE 3.4 – Images AFM topographiques 2D (à gauche), coupe transversale (milieu) et images AFM topographiques 3D (droite)-mesures locales d'épaisseur sur les différentes bicouches Chol/SM/PC (A) et SM/PC (B).

Des études effectuées a posteriori ont montré une grande difficulté dans l'obtention d'une solution homogène de liposomes avec de telles compositions. Des mesures DLS ont montré que le protocole suivi permettait d'obtenir majoritairement des vésicules multi-lamellaires (MLV, *Multi Lamellar Vesicle*) et seulement quelques liposomes d'une taille d'environ 170 nm.

Les spectres infrarouges (fig 3.5) montrent deux pics autour de 2919 et 2850  $\text{cm}^{-1}$  correspondant respectivement aux bandes de vibrations antisymétriques ( $\nu_{as}$ ) et symétriques ( $\nu_s$ ) des  $\text{CH}_2$  des lipides et un pic vers 1730  $\text{cm}^{-1}$  correspondant à la bande de vibration des C=O ester ( $\nu_{C=O}$ ) des lipides, caractéristiques des phospholipides [207]. La position et le profil de ces pics nous montrent que les couches lipidiques obtenues ne sont pas totalement bien organisées. Ceci peut s'expliquer par le fait que le dépôt des lipides n'est pas contrôlé puisqu'on utilise des liposomes et parce que la couche lipidique obtenue est certainement constituée d'un empilement de bicouches.

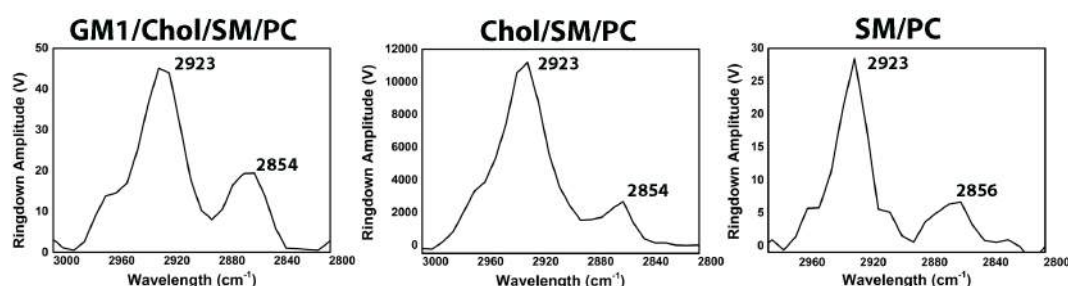


FIGURE 3.5 – Spectre IR correspondant aux trois compositions lipidiques GM1/Chol/SM/PC (à gauche), Chol/SM/PC (au milieu) et SM/PC (à droite) dans la zone de vibration des  $\text{CH}_2$  des lipides entre 3000 et 2800  $\text{cm}^{-1}$

Sur les spectres (fig 3.6) qui ont été obtenus dans la même zone que les spectres des bandes des CO des lipides, on observe également un pic dans la région amide qui peut être attribué aux groupements CO-amide présents dans la sphingomyéline (SM) et le GM1. Pour la composition GM1/Chol/SM/PC, cette contribution est très importante car le GM1 contient trois groupements amides contre une seul pour la sphingomyéline. La bande correspondant à la contribution des GM1 est située vers 1636  $\text{cm}^{-1}$  et celle de la sphingomyéline autour de 1660  $\text{cm}^{-1}$  (variable selon l'environnement). La présence de cette bande nous empêche d'assigner une structure secondaire des peptides en interaction avec les différentes couches lipidiques, car il serait difficile d'évaluer la contribution exacte des lipides dans le profil global de la bande amide I. De plus, nous avons pu observer une variabilité de l'intensité de la bande correspondant aux GM1 d'un spectre à l'autre, ce qui peut être du à l'hétérogénéité du dépôt lipidique.

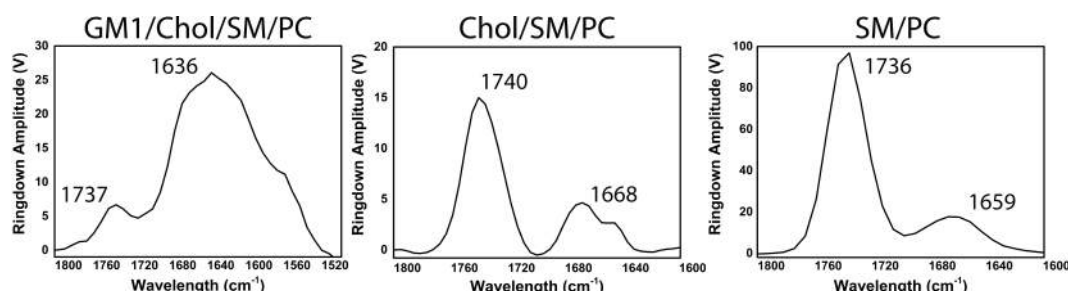


FIGURE 3.6 – Spectres IR correspondant aux trois compositions lipidiques GM1/Chol/SM/PC (à gauche), Chol/SM/PC (au milieu) et SM/PC (à droite) dans la zone de vibration des CO ester des lipides et des CO amide entre 1800 et 1500  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.2.2.2 Interaction des peptides d'A $\beta$ avec le modèle GM1/ Chol/ SM/ PC

Une fois les multicouches analysées, 30  $\mu$ L des différents peptides (fraîchement décongelés, sous la forme monomère pour WT et mG37C et oligomère pour oG37C) à une concentration de 20  $\mu$ M est ajoutés à la couche lipidique et mis en incubation pour environ 20h dans des conditions humides afin que la solution ne sèche pas. Au bout de 20h, la goutte de solution peptidique est séchée à température ambiante. Chaque peptide, WT, mG37C et oG37C a été incubé avec chaque composition lipidique (GM1/Chol/SM/PC, Chol/SM/PC et SM/PC).

Les analyses ont été menées sur des multicouches composées de GM1/Chol/SM/PC dans le but d'observer un changement spectral et/ou morphologique attestant de l'interaction avec les peptides.

L'analyse des images AFM permet de mettre en avant une grande différence de morphologie entre les différents peptides déposés à la surface de la couche lipidique. On observe une grande différence entre les images de la couche de GM1/Chol/SM/PC seule (fig 3.7) et celles après dépôt des peptides. Après interaction avec le peptide WT, la couche paraît moins lisse. Les espèces qui se sont déposées recouvrent la surface sur plusieurs épaisseurs et apparaissent comme des dépôts hétérogènes. L'oligomère semble avoir formé des agrégats amorphes recouvrant la surface de manière homogène contrairement aux images obtenues pour le monomère G37C, sur lesquelles on peut observer de gros amas amorphes regroupés en certains endroits de la couche lipidique, de taille et d'épaisseur beaucoup plus hétérogènes. Sur toutes les images, on observe la présence de lacunes.

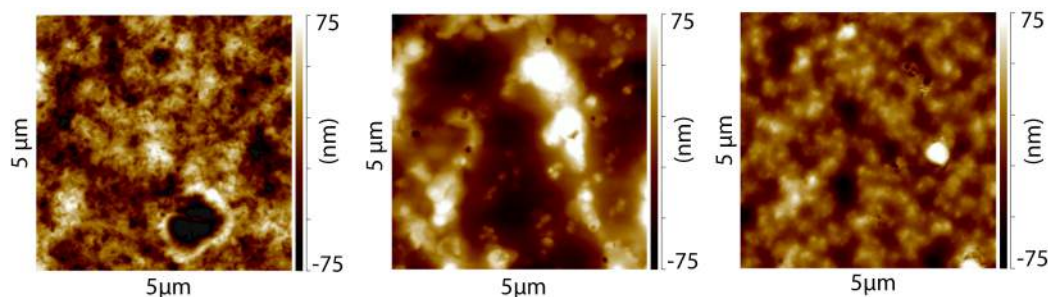


FIGURE 3.7 – Images AFM topographiques (gauche) 5x5 $\mu$ m des différents peptides WT (haut), mG37C (milieu) et oG37C (bas) en interaction avec la multicouche de GM1/Chol/SM/PC.

Les spectres IR obtenus nous apportent des informations sur l'interaction des peptides avec les lipides. Nous avons alors pu comparer les spectres avant (courbes verte en pointillé) et après (courbes noires en trait continu) l'ajout des peptides (fig 3.8). Les amplitudes mesurées sont corrélées à l'épaisseur de la couche : pour une même composition, une couche épaisse absorbe plus qu'une fine couche. Nous n'avons pas été en mesure de contrôler l'épaisseur de nos dépôts. Les mesures des lipides seuls et après l'ajout des peptides ne peuvent pas être effectuées au même endroit. Les spectres IR ont donc été normalisés sur la bande CO des lipides pour pouvoir les comparer entre eux. Il est important de noter qu'avec cette technique il n'est possible de comparer les amplitudes spectrales que dans une même région (ici 1800-1500  $\text{cm}^{-1}$ ). On peut donc seulement comparer le pic du CO des lipides à la bande amide I mais pas aux bandes de vibrations des CH<sub>2</sub> des lipides car le laser utilisé entre 1200 et 2500  $\text{cm}^{-1}$  est différent de



celui utilisé pour la zone entre 2500 et 3000  $\text{cm}^{-1}$ . Puisque notre objectif était l'observation de l'interaction des peptides sur des multicouches lipidiques, nous nous sommes concentrés sur la zone entre 1800 et 1500  $\text{cm}^{-1}$ .

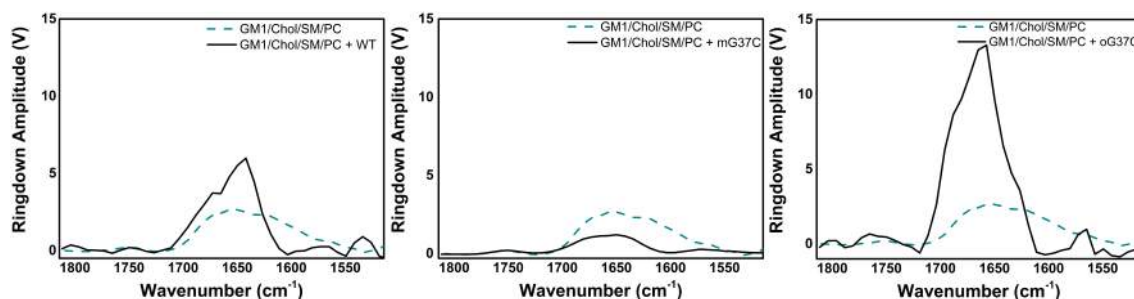


FIGURE 3.8 – Spectres IR des différents peptides WT (haut), mG37C (milieu) et oG37C (bas) en interaction avec la multicouche de GM1/Chol/SM/PC dans la zone amide. La courbe verte en pointillée correspond à la couche lipidique et la courbe noire à l'interaction avec les peptides.

Sur les spectres obtenus on peut observer deux comportements : soit une augmentation de la bande amide I (pour WT et oG37C) soit sa diminution (pour mG37C). La diminution observée pour le peptide mG37C peut s'expliquer par l'hétérogénéité de l'échantillon et peut donc être considérée comme étant négligeable. Nous pouvons conclure que le peptide mG37C n'a pas interagit avec la couche de GM1/Chol/SM/PC contrairement aux deux autres peptides. Pour WT et oG37C on observe une augmentation de l'intensité de la bande amide I que l'on peut associer à la présence des peptides. On observe qu'en présence de l'oligomère G37C l'amplitude mesurée est environ deux fois plus importante qu'avec WT. Ces résultats montrent que les peptides WT et oG37C interagissent avec les bicouches lipidiques en présence de GM1 et de cholestérol ce qui est en accord avec la littérature [190].

Les lipides GM1/Chol/SM/PC avaient été choisi pour se rapprocher au mieux des membranes neuronales mais la présence de GM1, qui a une forte contribution infrarouge dans la zone amide ainsi que sur la bande CO des lipides, nous empêche toute comparaison avec les autres systèmes lipidiques proposés (Chol/SM/PC et SM/PC). Nous avons ensuite tenté de déterminer l'importance du cholestérol dans l'interaction d'A $\beta_{1-42}$  avec des couches lipidiques.

### 3.2.2.2.3 Importance du cholestérol dans l'interaction d'A $\beta$ avec des modèles membranaires

Les images AFM obtenues avec l'oligomère G37C (fig 3.9) montrent des résultats différents selon la composition lipidique étudiée. Avec SM/PC on observe la formation d'objets sphériques recouvrant toute la surface alors qu'en présence de Chol/SM/PC les peptides ressemblent plus à des agrégats répartis de manière homogène sur toute la surface. Il est important de noter que la présence de ces agrégats, qui semblent épais, pourraient être dû à un effet topographique lié à l'hétérogénéité du dépôt lipidique qu'ils recouvrent.

Puisque, dans ces deux mélanges, la seule contribution de la bande CO des lipides provient de POPC, les spectres IR obtenus ont pu être normalisés sur cette bande en fonction de la proportion de POPC dans les différentes compositions lipidiques, 60% et 80% respectivement dans Chol/SM/PC et SM/PC. Nous sommes ensuite en mesure de comparer qualitativement

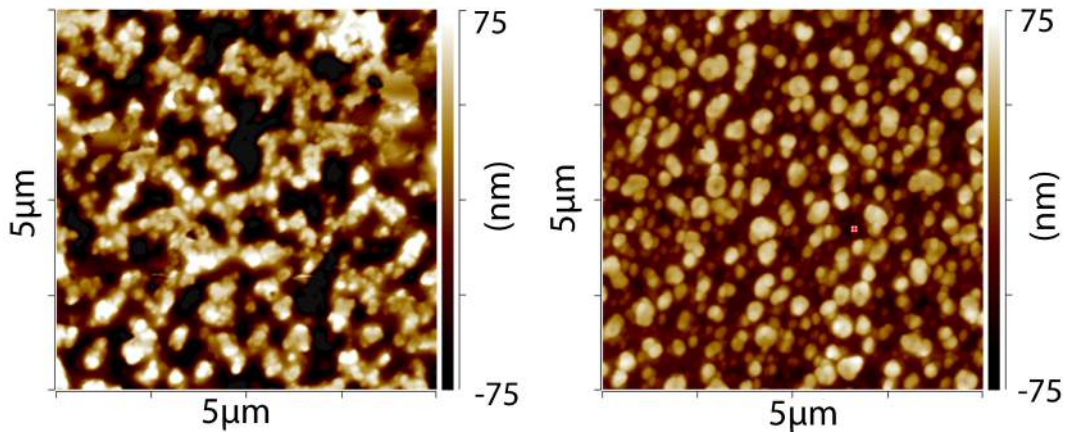


FIGURE 3.9 – Images AFM de l'oligomère G37C (20  $\mu$ M) en interaction avec différentes multicouches : Chol/SM/PC (20/20/60) et SM/PC (20/80).

les interactions des peptides avec les deux types de composition lipidique. Sur les spectres de l'oligomère G37C on observe des différences, on peut noter une augmentation du pic de la zone amide quand le peptide est incubé sur la couche de Chol/SM/PC mais pas de modification de l'intensité de cette bande avec la couche de SM/PC (fig 3.10). Cette augmentation peut être associée à la bande de vibration de l'oligomère G37C mais à cause de la contribution de la sphingomyéline nous ne sommes pas en mesure d'attribuer une structure au peptide en interaction avec la couche lipidique. On peut établir une corrélation entre l'interaction des peptides et les différentes compositions lipidiques et montrer que oG37C a une affinité pour les compositions contenant du cholestérol, composant nécessaire à l'interaction.

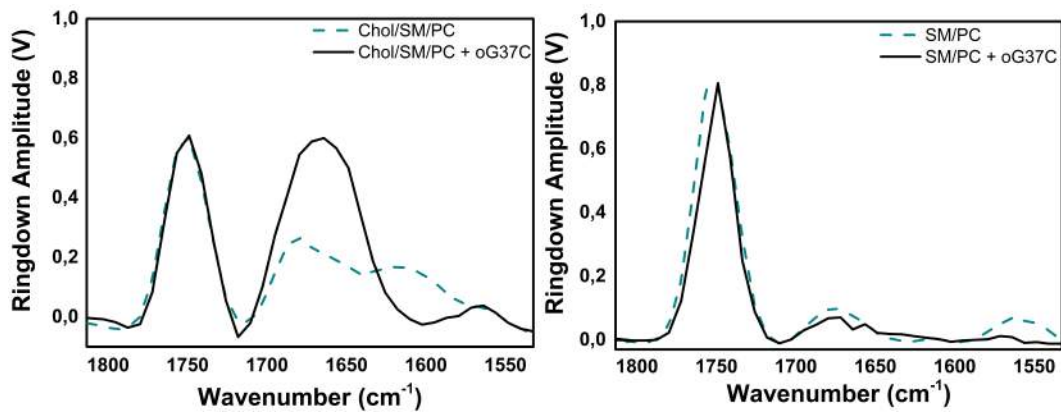


FIGURE 3.10 – Spectres IR de l'oligomère G37C (20  $\mu$ M) en interaction avec différentes multicouches : Chol/SM/PC (20/20/60) et SM/PC (20/80) dans la zone des bandes de vibration amide. Les courbes vertes pointillées correspondent aux couches lipidiques et les courbes noires aux couches lipidiques en interaction avec oG37C.

Les images AFM du peptide WT sur les modèles Chol/SM/PC et SM/PC présentent elles aussi deux morphologies différentes. On observe qu'en présence de cholestérol, WT adopte une morphologie qui ressemble à celle de l'oligomère G37C (fig 3.11) en interaction avec la couche de Chol/SM/PC formant ce qui ressemble à des agrégats amorphes recouvrant toute la surface.

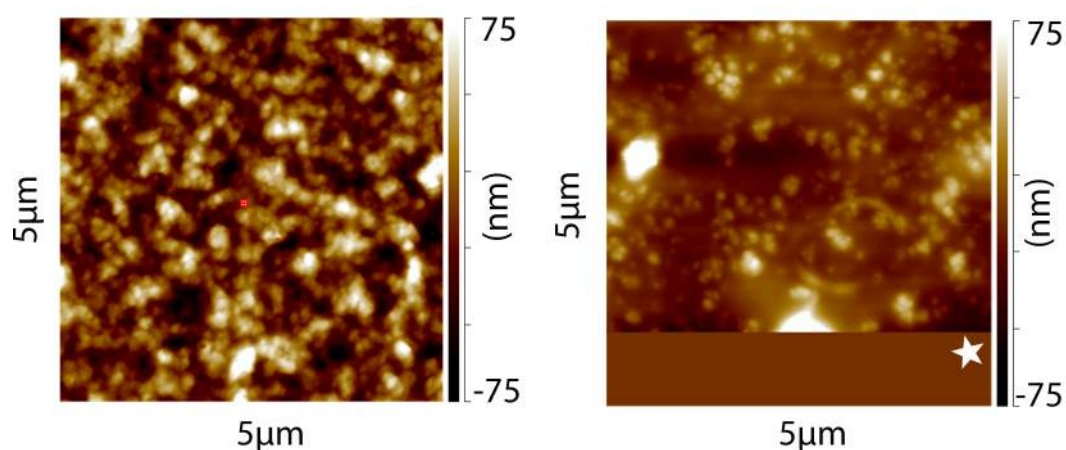


FIGURE 3.11 – Images AFM du monomère WT ( $20\mu\text{M}$ ) en interaction avec différentes multicouches : Chol/SM/PC (20/20/60) et SM/PC (20/80). L'étoile blanche indique que l'enregistrement de l'image a été interrompu avant la fin.

Pour l'interaction de WT avec la couche de SM/PC, les spectres IR ne montrent aucune affinité (fig 3.12). On observe des objets sphériques rassemblés en petits îlots de manière éparse sur la surface de SM/PC.

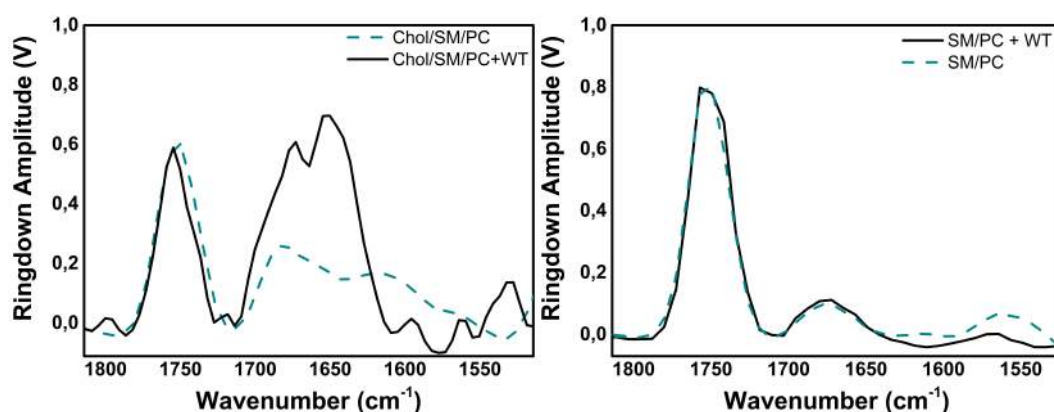


FIGURE 3.12 – Spectres IR du monomère WT ( $20\mu\text{M}$ ) en interaction avec différentes multicouches : Chol/SM/PC (20/20/60) et SM/PC (20/80) dans la zone des bandes de vibration amide. Les courbes vertes pointillées correspondent aux couches lipidiques et les courbes noires aux couches lipidiques en interaction avec WT.

On peut observer sur les images AFM correspondant à l'interaction du monomère G37C (fig 3.13) avec les couches lipidiques Chol/SM/PC et SM/PC qu'il y a eu un dépôt du peptide sur la couche lipidique (changement de morphologie).

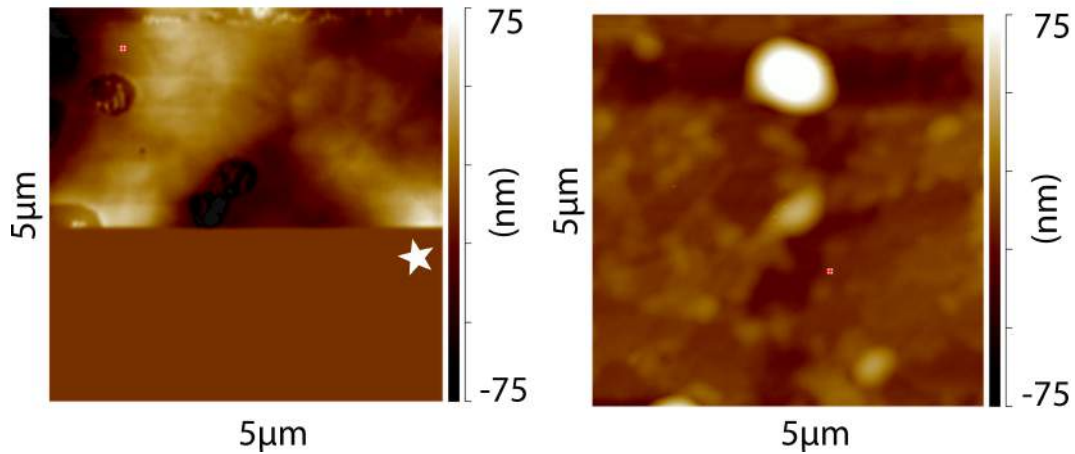


FIGURE 3.13 – Images AFM du monomère G37C (mG37C) ( $20\mu\text{M}$ ) en interaction avec différentes multicouches : Chol/SM/PC (20/20/60) et SM/PC (20/80). L'étoile blanche indique que l'enregistrement de l'image a été interrompu avant la fin.

Le monomère G37C adopte un comportement inverse à WT et oG37C. En présence de multicouches de Chol/SM/PC, mG37C ne semble pas interagir ce qui se traduit par l'absence de modification majeure au niveau de la bande amide I entre  $1700$  et  $1500\text{ cm}^{-1}$ . Comme observé précédemment avec WT et oG37C en présence de SM/PC l'amplitude mesurée est légèrement diminuée après interaction avec le peptide ce qui peut donc être attribué à l'hétérogénéité de la couche et de la distribution des microdomaines de sphingomyéline (fig 3.14). Au contraire, en présence de couche SM/PC, l'amplitude de la bande amide est augmentée ce qui correspond à l'interaction de mG37C pour ce type de dépôt lipidique (fig 3.14).

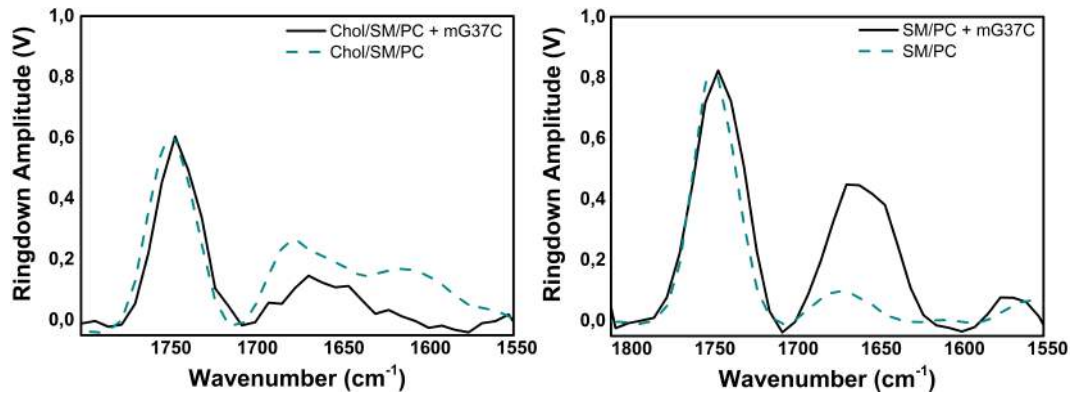


FIGURE 3.14 – Spectres IR du monomère G37C (mG37C) ( $20\mu\text{M}$ ) en interaction avec différentes multicouches : Chol/SM/PC (20/20/60) et SM/PC (20/80) dans la zone des bandes de vibration amide. Les courbes vertes pointillées correspondent aux couches lipidiques et les courbes noires aux couches lipidiques en interaction avec mG37C.

La présence du cholestérol semble nécessaire pour induire la forte interaction entre l'oligomère G37C et les membranes ce qui est en accord avec une récente étude sur A $\beta_{1-40}$  [208]. Cette étude montre que le cholestérol facilite l'oligomérisation d'A $\beta$  engendrant des perturbations de la membrane et accentue la cytotoxicité du peptide. On obtient les mêmes résultats avec WT ce qui peut s'expliquer par le fait que dans sa cinétique d'auto-assemblage, WT forme des oligomères capable d'interagir avec les membranes. Liu a montré que l'effet du cholestérol est directement

corrélé à sa quantité dans les membranes. Une teneur en cholestérol plus faible que la teneur normale des membranes neuronales semble favoriser la sélection d'espèces intermédiaires tels que des oligomères [208]. De plus, cette étude révèle deux comportements dépendant de l'état d'agrégation d'A $\beta$  : les oligomères sont insérés dans la membrane alors que les monomères sont faiblement adsorbés à la surface des membranes. Ce qui est en accord avec nos résultats.

### 3.2.3 Discussion et conclusions

Avec la technique du nanoIR, nous sommes capables d'observer un changement morphologique suite à l'interaction de peptides d'A $\beta_{1-42}$  avec une couche lipidique et surtout nous pouvons obtenir des spectres IR correspondant à cette interaction. Le protocole mis en place présente quelques difficultés au niveau de l'homogénéité de l'échantillon mais il nous permet d'observer les différences d'interaction entre les peptides et la couche lipidique et aussi de détecter l'absence d'interaction.

La technologie nanoIR nous a permis d'observer les fibres des différents mutants d'A $\beta_{1-42}$  par AFM, mais comme l'appareil utilisé ne possédait pas le module nécessaire à l'acquisition de spectres IR sur des zones peu épaisses, nous avons seulement été en mesure d'enregistrer les spectres sur des amas de fibres.

Lors des expériences d'interaction avec les membranes, nous avons pu mettre en évidence le rôle du cholestérol qui semble favoriser l'interaction des peptides A $\beta_{1-42}$  et mutants avec les membranes. Nous avons aussi pu observer peu ou pas d'interaction avec le système SM/PC, ce qui est en accord avec les résultats obtenus précédemment avec les membranes DOPC.

Ces résultats sont prometteurs, mais les expériences n'ont été faites qu'une seule fois, il est donc impératif de les répéter pour pouvoir conclure avec certitude.

Les principales difficultés d'interprétation de certains résultats sont liées à la technique et à l'hétérogénéité de la surface formée. Il est également impossible d'effectuer la mesure après incubation avec les peptides à l'endroit de la mesure des lipides seuls, il peut donc y avoir une différence d'épaisseur. Contrairement aux résultats obtenus dans le chapitre précédent, qui montraient que le monomère G37C adoptait un comportement similaire à l'oligomère G37C en présence de membranes, les spectres obtenus avec le nanoIR ne montrent pas d'interaction. On peut supposer que la zone sondée était pauvre en GM1 et que ces derniers sont essentiels à l'interaction avec les peptides.

De même, les résultats obtenus pour les interaction des peptides avec les compositions lipidiques SM/PC et Chol/SM/PC sont très étonnants. Les résultats montrent une interaction entre le monomère G37C et les dépôts lipidiques SM/PC alors que lors de l'étude précédente (chapitre 2) aucune interaction n'a été observée entre les peptides et les membranes de DOPC (PWR, fluorescence de la calcéine). Néanmoins, nous avons déjà observé un comportement similaire avec les expériences de fluorescence de la ThT. Nous n'avons à ce jour pas trouvé d'explication logique à ce comportement. Les interactions entre mG37C et les multicouches de SM/PC ont été répétées et des observations ont été effectuées en plusieurs points de l'échantillon pour écarter un possible artefact de mesure, mais nous avons retrouvé les mêmes résultats.

La technique nanoIR telle qu'utilisée dans nos travaux présente des inconvénients pour ce genre d'étude :

- Épaisseur minimale nécessaire à la détection = 100 nm
- Protocole d'interaction lipide/peptide à améliorer pour des multicouches < à 500nm
- Échantillon à sec donc loin des conditions physiologiques
- Pas de rinçage donc observation des interactions spécifiques et non-spécifiques (ce qui expliquerait une partie des résultats par l'observation des agrégats non-spécifiques déposés

à la surface de la couche lipidique)

- impossibilité d'effectuer les mesures au même endroit avant et après interaction avec les peptides

La technique reste pourtant très prometteuse puisqu'avec les améliorations technologiques mises en place nous serions en mesure d'obtenir des informations sur la structure de l'échantillon à l'échelle nanométrique. Cette propriété en fait un outils de choix qui apporterait des informations locales quand la spectroscopie infrarouge classique nous donne une réponse moyenne.

### **MESSAGE A RETENIR**

- Accès à la morphologie et la structure secondaire des peptides d'A $\beta_{1-42}$  *in situ*
- Interaction en présence de GM1 et Cholestérol
- Importance du cholestérol pour l'interaction avec des membranes

## Chapitre 4

# Conception d'une cellule microfluidique : pour étudier l'auto-assemblage des fibres amyloïdes





## 4.1 Introduction

Les protéines amyloïdes ont la caractéristique de s'auto-assembler pour former des espèces de plus grand poids moléculaire qui peuvent être des oligomères, des protofibrilles ou des fibres. C'est un aspect dont il est important de tenir compte lorsqu'on étudie les amyloïdes et leur interaction avec des membranes. Les mécanismes de fibrillation et la corrélation entre la capacité de ces protéines à s'auto-assembler et la toxicité qu'elles présentent *in vivo* sont loin d'être totalement compris même s'il est maintenant admis que la toxicité des amyloïdes est due à l'interaction d'espèces intermédiaires avec les membranes [209]. Plusieurs hypothèses existent, certains auteurs proposent que ces espèces seraient formées lors du processus d'auto-assemblage (*on-pathway*) [4] mais d'autre pensent que les intermédiaires toxiques seraient formées hors du processus de fibrillation (*off-pathway*) [5] [6].

La principale difficulté pour étudier ces oligomères solubles est leur caractère instable, changeant d'état au cours de l'auto-assemblage. L'intérêt de la microfluidique est que cette technique permet de suivre *in situ* les interactions moléculaires et également de pouvoir séparer ces différents états une fois révélés et caractérisés [210] [211].

La technologie microfluidique se base sur les écoulements de fluides simples ou complexes, mono ou multiphasiques, dans des canaux de dimensions comprises entre 1 et 1000  $\mu\text{m}$  [212] [213]. La taille du système et le flux lamellaire qui en découle permettent de contrôler la concentration moléculaire en temps et dans l'espace. La microfluidique en flux lamellaire est très utilisée pour l'étude des systèmes biologiques car elle demande une faible quantité d'échantillon et permet l'observation de phénomènes rapides de l'ordre de la milliseconde en créant un état stable en un point d'observation donné [214]. Cette dernière caractéristique permet de coupler la microfluidique à des techniques de détection demandant un temps d'acquisition plus long que les phénomènes observés, comme les microscopies optiques.

Le système microfluidique le plus développé et le plus maîtrisé pour les couplages avec la spectroscopie optique est le montage verre-PDMS. La technologie PDMS (Poly(DiMéthylSiloxane)) a vu le jour à la fin des années 90 et a tout de suite été adoptée comme méthode privilégiée de microfabrication grâce à sa simplicité de mise en oeuvre et sa compatibilité avec de nombreuses techniques spectroscopiques telles que la fluorescence ou la diffusion Raman pour la détection de molécules biologiques [215] [216] [217] [218] [219] [220]. Néanmoins, ce procédé est très peu utilisé pour la spectroscopie infrarouge à cause du signal produit par le PDMS sur les spectres et de l'absorption du verre en IR.

Notre objectif était de concevoir une cellule microfluidique compatible avec la spectroscopie FTIR afin d'étudier le processus d'auto-assemblage des fibres amyloïdes. C'est dans l'optique de mieux comprendre le mécanisme d'auto-assemblage d'  $A\beta_{1-42}$  que nous avons tenter de développer au sein de notre équipe un système microfluidique adapté au couplage avec la spectroscopie infrarouge. L'imagerie infrarouge est une technique de choix pour la détermination des structures secondaires des peptides et leur distribution spatiale au sein du canal [221] [222] [223]. Cette technique permet de distinguer les structures secondaires en feuillets- $\beta$  parallèles des structures en feuillets- $\beta$  anti-parallèle. Cette caractéristique est particulièrement pertinente pour l'étude d'  $A\beta_{1-42}$  qui présente un changement de structuration au cours du temps : les oligo-

mères adoptent une structure en feuillets- $\beta$  anti-parallèles alors que les fibres sont structurées en feuillets- $\beta$  parallèles [100] [4] [5] [6].

## 4.2 Hydrodynamique des fluides dans les systèmes microfluidiques

La technologie microfluidique a émergé comme une discipline importante permettant la découverte de nouveaux phénomènes grâce à ses dimensions proches de la taille des macromolécules ou nanoparticules (protéines, ADN...). L'écoulement des fluides au travers d'un canal d'une dimension variant de quelques dizaines à quelques centaines de microns implique la création de problèmes hydrodynamiques découlant de l'importance du ratio surface/volume à cette échelle, de la présence du mouvement Brownien et la création de forces spécifiques (forces capillaires). Les grandeurs physiques expliquant l'écoulement de fluides à grande échelle doivent être adaptées au contexte spécifique des microsystèmes par le biais de nombreuses caractéristiques (nombre de Reynolds, nombre de Peclet) et de lois physiques (Stokes, Poiseuille) décrites en annexe. Dans le cadre de la conception d'une cellule microfluidique pour l'étude de la cinétique des protéines amyloïdes, nous nous concentrerons sur les propriétés physiques des écoulements laminaires monophasique.

## 4.3 Cahier des charges

La spectroscopie infrarouge est une technique performante pour l'identification de composés et l'observation de changements structuraux. L'objectif du développement d'une cellule microfluidique couplée à la microscopie infrarouge était de pouvoir suivre *in situ* l'auto-assemblage d'amyloïde et plus précisément d'A $\beta_{1-42}$ . La principale difficulté de l'étude des protéines en milieu physiologique par infrarouge provient de la forte signature infrarouge de l'eau (bande vibration de déformation  $\delta_{OH}$  vers  $1640\text{ cm}^{-1}$ ) qui se situe dans la même zone que les bandes de vibration CO de la liaison amide (entre  $1600$  et  $1700\text{ cm}^{-1}$ ). La microfluidique permet d'une part de pouvoir observer toutes les espèces formées au cours du temps en créant un état stationnaire en un point donné du canal et d'autre part, si le trajet optique est inférieur à  $10\mu\text{m}$  de pouvoir soustraire la contribution de l'eau sur les spectres IR et donc d'obtenir la signature des protéines.

La mise en oeuvre de cette cellule nous a imposé de nombreuses contraintes dans la fabrication.

### 4.3.1 Échantillonnage

#### 4.3.1.1 Détermination du matériau

La première contrainte concerne le choix des matériaux. En effet les matériaux traditionnellement utilisés pour la fabrication de cellules microfluidiques (verre, quartz, silicium) ne sont pas compatibles avec une observation dans le moyen infrarouge ( $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ ) car peu transpa-

rent dans la zone spectrale permettant l'identification des structures secondaires des protéines. Comme nous pouvons le voir sur les spectres de transmittance des différents matériaux disponibles représentés par Hinsmann *et al* [210], c'est le  $\text{CaF}_2$  qui présente le meilleur profil pour des applications de détection dans le moyen infrarouge (fig 4.1). Dans la zone d'observation des bandes amide I et amide II des protéines (entre  $1400$  et  $1600 \text{ cm}^{-1}$ ), le  $\text{CaF}_2$  a une transmittance proche de 95%.

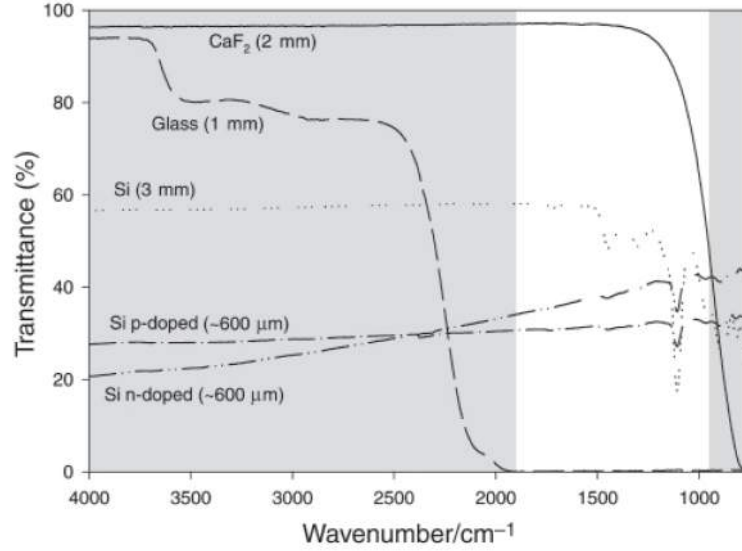


FIGURE 4.1 – Comparaison de la transmittance dans le moyen infrarouge ( $700\text{-}4000\text{cm}^{-1}$ ) du  $\text{CaF}_2$  et différents matériaux généralement utilisés pour les systèmes microfluidiques [210].

#### 4.3.1.2 Géométrie du système

L'utilisation du  $\text{CaF}_2$  nous permettra d'étudier la structure secondaire d' $\text{A}\beta_{1-42}$  tout au long de son auto-assemblage, mais nous avons aussi adapté la géométrie du canal pour pouvoir déterminer la cinétique de formation des fibres amyloïdes. Pour le suivi cinétique d' $\text{A}\beta$ , nous avons choisi un motif de canal en "Y" avec une approche de diffusion des fluides monophasiques par co-écoulement de deux fluides en parallèle [224]. Dans notre cas, les deux solutions sont des phases aqueuses. Il y aura donc formation d'un cône de diffusion dans lequel il y aura inter-diffusion des deux fluides (fig 4.2).

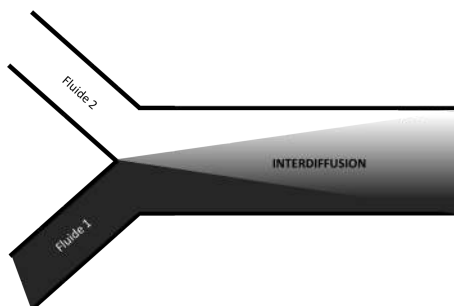


FIGURE 4.2 – Cône d'interdiffusion de deux fluides injectés dans les deux entrées du canal microfluidique.

Les écoulements sont laminaires, c'est à dire que les fluides se mélangent uniquement par diffusion moléculaire pour un débit, une température et une viscosité donnés. Cette propriété implique que la concentration en un point donné du canal reste invariable ce qui permet d'accumuler les spectres IR d'une espèce donnée en un point et ainsi d'améliorer le rapport signal/bruit.

La difficulté de l'étude des amyloïdes provient de leur tendance à s'auto-assembler dès qu'ils sont dans des conditions physiologiques. Pour obtenir la cinétique complète de fibrillation, les peptides seront injectés dans une solution à pH basique (NaOH) constitueront le fluide 1 et une solution permettant la neutralisation du mélange sera injectée dans le second canal (Tampon Tris + HCl, fluide 2). Des tests de suivi par Thioflavine T ont montré que l'agrégation d'A $\beta_{1-42}$  était stoppée en solution basique mais que les peptides étaient capables de former de nouveau des assemblages en milieu neutre (fig 4.3). Au contact des deux solutions l'agrégation d'A $\beta$  commence et peut être corrélée à l'évolution des spectres infrarouges au cours du temps.

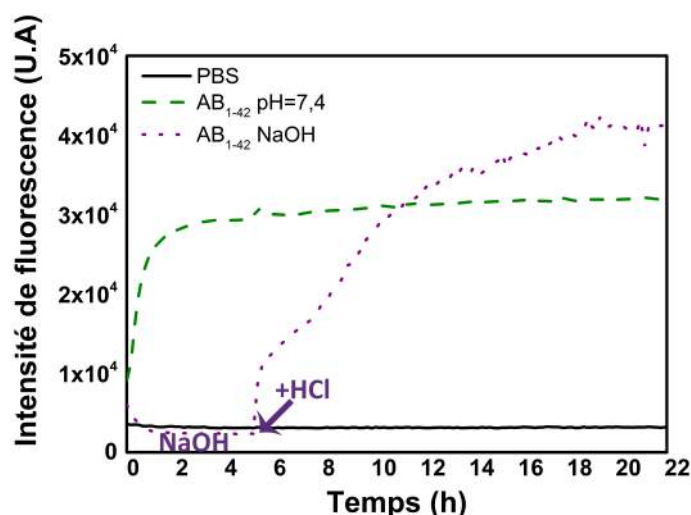


FIGURE 4.3 – Test de suivi de la fluorescence de la ThT d'A $\beta_{1-42}$  à pH physiologique (courbe verte) et dans la soude et après neutralisation par HCl (courbe violette). La courbe noire correspond au tampon seul.

#### 4.3.1.3 Dimensions du canal

La dernière contrainte liée à l'étude de la cinétique d'auto-assemblage des peptides d'A $\beta$  par spectroscopie infrarouge est la bande d'absorption de l'eau qui se situe dans la zone spectrale de

l'amide I des protéines. Pour pouvoir observer les protéines en milieu physiologique, l'épaisseur de la cellule microfluidique ne doit pas être supérieure à  $10\ \mu\text{m}$  pour ne pas saturer le signal et ainsi pouvoir soustraire la contribution de l'eau [210]. Une autre manière de contourner le problème de l'absorption de l'eau serait d'utiliser le  $\text{D}_2\text{O}$  dont les bandes d'absorptions sont décalées vers les plus bas nombres d'onde ( $\delta\text{OD}$  vers  $1200\ \text{cm}^{-1}$ ) et donc n'interfère plus avec le signal des protéines. Des études par spectroscopie FTIR couplées à la microfluidique ont déjà été réalisées en  $\text{D}_2\text{O}$  avec des cellules plus épaisses : Kakuta *et al* ont pu détecter la transition structurale de l'ubiquitine induite par le méthanol à  $\text{pH}=2$  dans des canaux de  $25\ \mu\text{m}$  [214]. L'étude de Prim *et al* [222] a permis de mesurer en continue les changements structuraux de la protéine poly-L-lysine en fonction du pH. Mais le  $\text{D}_2\text{O}$  complexifie les expérimentations avec les protéines amyloïdes lors des manipulations à cause des échange HOD mais aussi au niveau de la purification des protéines.

Récemment, Polshin *et al* ont développé une puce microfluidique couplée à la microscopie FTIR dont l'épaisseur du canal est inférieure à  $10\ \mu\text{m}$  pour la détection de cinétiques enzymatiques (action de la glucose oxydase) [225] et Mitri *et al* ont établi un protocole de fabrication d'un système microfluidique dédié à la microspectroscopie FTIR de cellules (MCF-7, cellules du cancer du sein) [226]. A notre connaissance, il n'existe pas de système permettant le suivi *in situ* de la fibrillation des amyloïdes et de l'évolution de leur structure secondaire au cours du temps (fig 4.4).

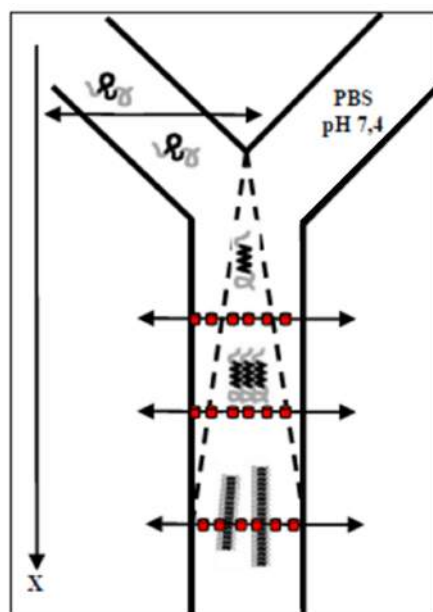


FIGURE 4.4 – Schéma de principe du suivi de l'auto-assemblage de peptides amyloïdes dans un canal microfluidique.

D'autre part, la largeur du canal a été optimisée pour améliorer le temps de diffusion au sein du canal. Le temps de diffusion ( $t$ ) est directement proportionnel à la largeur du canal ( $w$ ) il faut donc réduire la largeur du canal pour réduire temps d'obtention d'un mélange homogène

(éq 4.1).

$$t = \frac{w^2}{D} \quad (4.1)$$

Avec  $D$  le coefficient de diffusion (environ  $10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  pour l'eau). La largeur du canal doit tout de même être suffisante pour ne pas entraîner une surpression dans le canal qui pourrait provoquer son décollement. La largeur du canal a été optimisée à 1mm.

### 4.3.2 Méthodes de fabrication

Les systèmes microfluidiques ont la caractéristique d'avoir des dimensions de l'ordre du micromètre, l'impression des motifs sur les substrats se fait donc par le biais de techniques de microfabrication. Nous avons détaillé ci-après trois technologies que nous avons testés pour la fabrication de la cellule microfluidique.

#### 4.3.2.1 La photolithographie

La photolithographie est la technique de micro-lithographie la plus communément utilisée. La photolithographie consiste à imprimer un motif sur un substrat par le biais d'une résine photosensible (fig 4.5).

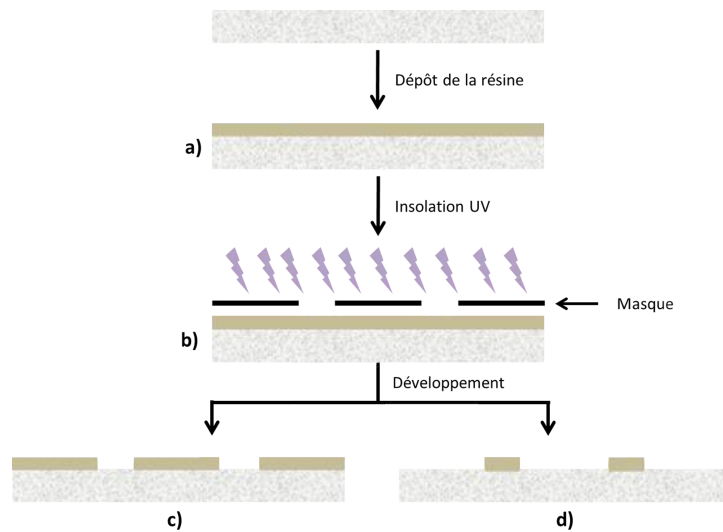


FIGURE 4.5 – Méthode de formation d'un canal microfluidique par lithographie douce (a : dépôt de la résine, b : insolation UV) en utilisant une résine positive (c) et négative (d).

Une fine couche de résine photosensible est déposée sur le substrat (faces de  $\text{CaF}_2$ ) par la technique de *spin-coating* qui permet de contrôler l'épaisseur de la couche déposée en adaptant la vitesse de la tournette (fig 4.6). Ensuite le substrat recouvert de résine est chauffé  $95^\circ\text{C}$  (pour ce type de résine) pendant un temps donné, il s'agit de l'étape de *soft-bake* qui sert à éliminer le solvant restant dans la couche de résine.

La couche de polymère est ensuite exposée à une radiation UV (365 nm) à l'aide d'un aligneur à travers un masque imprimé avec le motif souhaité, constitué de zones opaques et de zones transparentes. Nous avons utilisé un masque sur lequel les canaux étaient opaques dans une

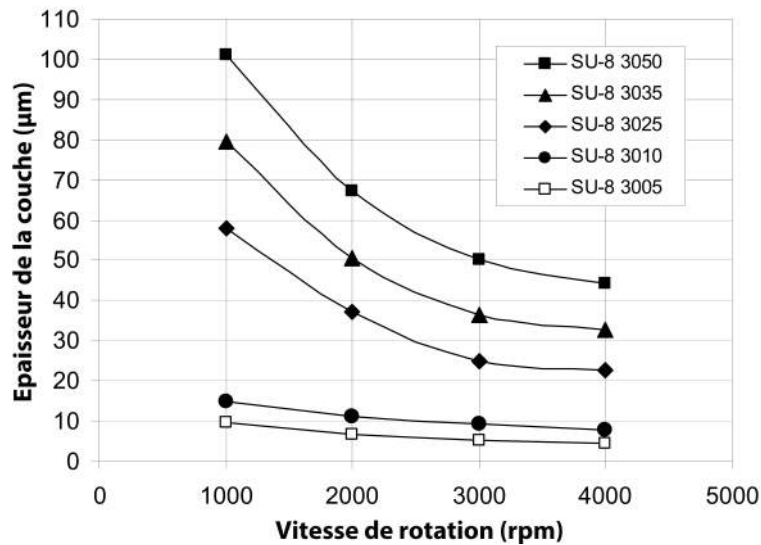


FIGURE 4.6 – Épaisseur de la couche de résine déposée en fonction de la vitesse de "spin-coating".

matrice transparente. La résine SU-8, qui est une résine négative, exposée à la lumière UV se réticule. Le motif du masque est alors transféré sur le film de résine. L'insolation est suivie d'une deuxième étape de chauffage qui permet de finaliser la réticulation de la résine. Avec la résine SU-8, les canaux qui étaient recouverts par le masque sont dissous (ou développés) dans un solvant spécifique, le PGMEA (Propylene Glycol Monomethyl Ether Acetate). Le temps de développement est adapté à l'épaisseur de la couche de résine.

#### 4.3.2.2 La gravure

La gravure consiste à soumettre un substrat, sur lequel certaines parties d'intérêt ont été protégées, à une attaque qui va venir creuser le substrat au niveau des zones non protégées. Il existe deux sortes de gravure :

- la gravure humide formant les canaux par une attaque chimique dans un solvant
- la gravure sèche formant les canaux par une attaque physique via des espèces ioniques contenues dans une phase gazeuse ou un plasma.

Nous avons testé la gravure humide dans un bain d'acide fluorhydrique (HF). La première étape consiste à définir le motif à graver et donc à protéger les autres parties du substrat. On utilise la lithographie pour cette étape selon le protocole décrit dans la section précédente. La face opposée du substrat est aussi protégée avec une couche de résine. Le substrat (face de  $\text{CaF}_2$ ) est ensuite couvert d'une deuxième couche protectrice en métal. Ce dernier est ensuite plongé dans un bain d'acide fluorhydrique qui va attaquer les parties non protégées par la résine. La profondeur de la gravure est contrôlée par le temps de réaction.

#### 4.3.2.3 Le moulage

La dernière technique utilisée est le micro-moulage par capillarité. Un moule en PDMS (Poly(DiMéthylSiloxane)) est tout d'abord formé par impression d'un motif formé sur un substrat



par lithographie (fig 4.7).

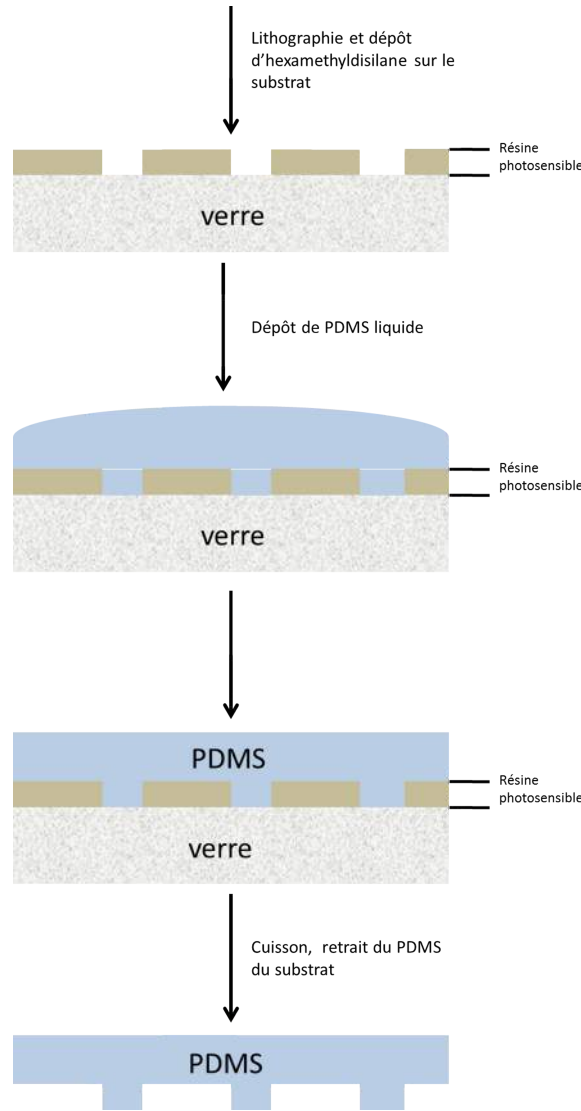


FIGURE 4.7 – Protocole de fabrication des moules en PDMS. Un motif est tout d’abord obtenu par photolithographie. Le motif est ensuite recouvert par le PDMS et l’ensemble est cuit en étuve à 65°C. Le moule en PDMS peut enfin être retiré du substrat.

Le moule de PDMS formé est ensuite placé sur la surface de  $\text{CaF}_2$  et établi un faible contact avec la surface. La structure en relief du PDMS forme un réseau de zones vides entourant le motif d’intérêt. A ce moment, on peut effectuer le dégazage du montage PDMS- $\text{CaF}_2$  pour que le contact du motif en relief avec le  $\text{CaF}_2$  soit homogène.

Lorsqu’on dépose une résine avec une faible viscosité à l’entrée du réseau, le liquide remplit spontanément les zones vides par capillarité [227]. La vitesse de remplissage ( $v$ ) est déterminée par la tension de surface ( $\gamma$ ), la viscosité de la résine ( $\eta$ ), au rayon du capillaire ( $R$ ) (ici épaisseur du canal) et à la longueur de la section du capillaire à remplir ( $z$ ).

$$v = \frac{R\gamma_{LG}\cos\theta}{4\eta z} = \frac{R(\gamma_{SG} - \gamma_{SL})}{5\eta z} \quad (4.2)$$

$\gamma_{LG}$ ,  $\gamma_{SG}$  et  $\gamma_{SL}$  correspondent respectivement aux tensions de surface aux interfaces liquide-gaz, solide-gaz et solide-liquide.

Une fois que le réseau est rempli par la résine, l'ensemble est exposé à une lumière UV, le moule en PDMS est retiré et il reste le réseau rempli par la résine à la surface du substrat. Le motif d'intérêt est donc en creux par rapport à la résine (fig 4.8, B).

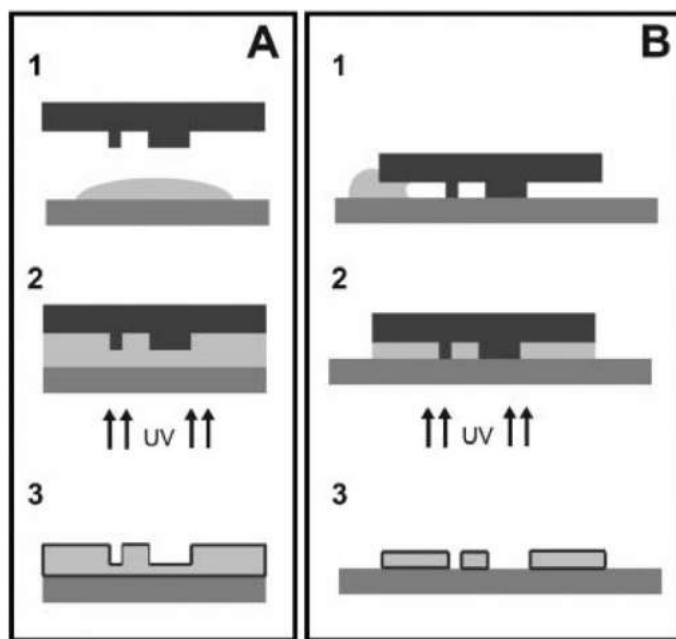


FIGURE 4.8 – Protocole de formation d'un canal microfluidique par micro-moulage [228]. Le motif peut être obtenu soit (A) en déposant la résine sur le substrat (1) et en le recouvrant par le moule en PDMS (2), soit (B) en déposant le moule en PDMS sur le substrat (1) et en faisant pénétrer la résine par capillarité (2). Dans les deux cas, le tout est ensuite insolé et le moule en PDMS retiré (3).

Différentes résine peuvent être utilisées pour le remplissage par capillarité de la cellule. Bartolo *et al* ont testé le protocole avec du PDMS, NOA-81 (Norland Optical Adhesive 81) et du PMMA (PolyMéthacrylate de Méthyle). La résine NOA-81 présente l'avantage d'être biocompatible et imperméable aux liquides et à l'air contrairement au PDMS [228].

## 4.4 Résultats

Plusieurs protocoles de fabrication ont été mis en oeuvre pour la fabrication de la cellule microfluidique optimisée pour la microscopie infrarouge. La principale difficulté résidait dans le fait de pouvoir observer les protéines amyloïdes dans l'eau ce qui imposait une hauteur de canal maximum de 10  $\mu\text{m}$ . Un premier prototype de cellule microfluidique, avec un simple canal en Y a été réalisé au laboratoire par Mlle HaPhuong Ta, en utilisant le processus de photolithographie avec la résine SU-8. Ce prototype avait permis d'obtenir les premiers spectres infrarouge d'une protéine : la polylysine prouvant la faisabilité du couple microfluidique/détection en ligne par spectroscopie infrarouge [229]. Ces premiers résultats prometteurs présentaient principalement des défauts d'étanchéité au niveau des zones d'injection. Ces fuites ne permettent pas un contrôle

précis des débits et par conséquent des vitesses. Il n'est alors pas possible de faire des mesures quantitatives.

#### 4.4.1 Résine SU-8

##### 4.4.1.1 Défauts du masque

Dans le but d'optimiser cette cellule nous avons commencé par reprendre le protocole établi avec la résine SU-8 sur plaque de  $\text{CaF}_2$  afin de régler le problème de fuites au niveau des zones d'injection et de tester sa validité. Plusieurs améliorations sur le motif ont été réalisées. La première étape a consisté à revoir le motif du canal en Y qui présentait un rétrécissement des voies d'injections au niveau de la zone d'injection que nous avons pensé être à l'origine des fuites observées (fig 4.9 A). Les motifs en carré qui étaient présents tout autour du canal, au départ dans le but d'obtenir un meilleur collage des deux faces en piégeant l'air, ont été supprimés car il nous semblait que la surface nécessaire au collage n'était pas suffisante. Seuls les carrés de contrôle se situant sur les bords de la cellule ont été conservés pour pouvoir faire les spectres de référence ("*background*") pour chaque mesure infrarouge. Sur le nouveau motif, les réservoirs se situant au niveau des points d'injection ont été retirés et les canaux d'entrée ont été élargis afin de conserver la même largeur que le canal principal (fig 4.9 B).

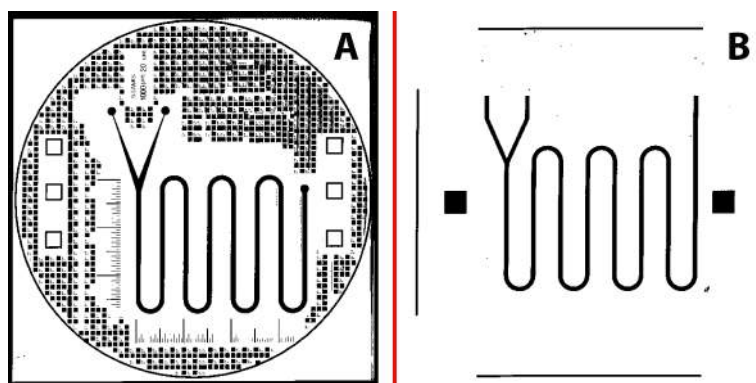


FIGURE 4.9 – Motifs des masques utilisés : avant (A) et après (B) optimisation. La largeur des masques est de 8 cm.

##### 4.4.1.2 Optimisation du protocole de microfabrication

Nous avons dans un premier temps appliqué le protocole établis précédemment par Thierry Robin lors de son stage de master (table 4.1). Selon ce protocole la résine négative SU-8 était déposée sur les deux faces formant la cellule microfluidique pour une épaisseur totale de maximum  $10\mu\text{m}$ . Nous avons obtenu respectivement pour chaque face  $5,8$  et  $5,5\mu\text{m}$ . Ces valeurs légèrement plus élevées que celles attendues sont certainement dues à la quantité de résine déposée lors du dépôt à la tournette (*spin-coating*) plus importante. Ces résultats étant convenables nous avons alors procédé au collage des deux faces sous presse en adoptant le protocole de T. Robin : rampe de chauffage pour atteindre une température proche de la température de fusion de la résine, plateau à cette température ( $110^\circ\text{C}$ ) et rampe descendante jusqu'à température ambiante. La

RESINE SU-8		Protocole T. Robin
Type de résine		SU-8 3005
Traitement plasma des faces		1 min
Dépôt de la résine	SC(rpm)	4000
	Accélération (rpm.s <sup>-1</sup> )	200
	Temps (s)	50
Soft Bake (T°C-minutes)		95°C-2min
Refroidissement des faces		10 min
Insolation (mJ.cm <sup>-2</sup> )		110
Post Exposure Bake		95°C-3min
Refroidissement des faces		10min
Développement dans PGMEA (s)		45
Epaisseur (μm)		3,5
Collage	Durée(s)	1 heure
	Température	120°C
	Pression	4bar

TABLE 4.1 – Protocole de fabrication d’une cellule microfluidique pour couplage à l’infrarouge établis par T. Robin lors de son stage de master.

cellule après collage présentait des irridescences. Lors du test de diffusion d’un liquide (H<sub>2</sub>O) dans le canal, nous avons observé que le canal n’était pas étanche par la présence de fuites.

A la fin du processus de lithographie, la profondeur des canaux est contrôlée avec un profilomètre Dektak 6M. Pour la fabrication de notre cellule microfluidique, nous avons testé deux méthodes, soit par dépôt de la résine sur les deux faces de CaF<sub>2</sub> soit en ne déposant la résine que sur une seule des faces et en collant cette dernière à une face vierge. Dans le premier cas, lors du collage des deux faces, il peut se poser le problème de l’alignement qui se fait manuellement mais le collage résine-résine est favorisé par la formation de liaisons chimiques covalentes. Dans le cas du dépôt de résine sur une seule face, il n’y a plus de problème d’alignement, mais l’affinité de la résine pour les faces de CaF<sub>2</sub> étant plus faible que pour elle même, des étapes d’activation des surfaces doivent être ajoutées pour l’améliorer.

A partir de ces observations de nombreux tests de protocoles ont été mis en oeuvre pour palier à ce problème de fuites (table 4.2 et 4.3). Les paramètres sur lesquels nous pouvions jouer étaient :

- revoir le système d’injection
- le temps et la température des *soft-bake*
- le temps et la température des *post-bake*
- la viscosité de la résine
- le temps, la température et la rampe de température du collage sous presse

Nous avons pu résoudre en partie les problèmes de fuite au niveau de l'injection en adaptant le système pour que le système d'injection se fasse dans le prolongement du canal, parallèle à celui-ci.

Type de modification	Collage	Post Bake	Soft Bake	Observations
Résine SU-8 3005				
Traitement plasma des faces		1 min		Substance des fuites
SC(rpm)		4000		Épaisseur > 5 $\mu\text{m}$
Dépôt de la résine				
Accélération ( $\text{rpm.s}^{-1}$ )		200		
Temps (s)		50		
Soft Bake( $^{\circ}\text{C}$ -minutes)				
	95 $^{\circ}\text{C}$ -2min	65 $^{\circ}\text{C}$ -2min	10 $^{\circ}\text{C}$ /min $\rightarrow$ 95 $^{\circ}\text{C}$	
			95 $^{\circ}\text{C}$ pdt 30s	
Refroidissement des faces		10 min		
Insolation ( $\text{mJ.cm}^{-2}$ )		110-7s		
			65 $^{\circ}\text{C}$	
Post Exposure Bake				
	95 $^{\circ}\text{C}$ -3min		10 $^{\circ}\text{C}$ /min $\rightarrow$ 95 $^{\circ}\text{C}$	
			95 $^{\circ}\text{C}$ pdt 30s	
Refroidissement des faces				
	10min			
Développement dans PGMEA (s)		45		
Epaisseur( $\mu\text{m}$ )				
	3,5	5,8-5,5	5,2-7,3	
T $^{\circ}\text{C}$ départ	35 $^{\circ}\text{C}$		65 $^{\circ}\text{C}$	
Rampe ascendante	10 $^{\circ}\text{C}$ /10min $\rightarrow$ 85 $^{\circ}\text{C}$		15 $^{\circ}\text{C}$ /10min $\rightarrow$ 95 $^{\circ}\text{C}$	
	5 $^{\circ}\text{C}$ /5min $\rightarrow$ 110 $^{\circ}\text{C}$		5 $^{\circ}\text{C}$ /5min $\rightarrow$ 110 $^{\circ}\text{C}$	
Plateau	1h à 110 $^{\circ}\text{C}$		1h à 110 $^{\circ}\text{C}$	
Rampe descendante	10 $^{\circ}\text{C}$ /10min $\rightarrow$ 25 $^{\circ}\text{C}$		20 $^{\circ}\text{C}$ /10min $\rightarrow$ 65 $^{\circ}\text{C}$	

TABLE 4.2 – Tests d'amélioration du protocole de T.Robin. Le collage est effectué sous presse à une pression de 4 bars.

Type de modification	Résines 3005, 3025	Résine 3050	Observations
Résine SU-8 3005 + C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O	+50 % C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O	+80 % C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O	
Traitement plasma des faces	1 min		Fluidification de la résine
SC(rpm)	3000-5000	3000-5000	avec la cyclopentanone (C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O)
Dépôt de la résine			
Accélération (rpm.s <sup>-1</sup> )	200-300	300-400	
Temps (s)	30-50	30-50	Épaisseur de la couche < 5 μm
Soft Bake(T°C-minutes)	65°C-1 ou 2min	65°C-1min ou rampe 65°C → 95°C	Problème d'évaporation du spin-coating → présence de bulles Substance des fuites
Refroidissement des faces	10 min		
Insolation (mJ.cm <sup>-2</sup> )	110-7s		
Post Exposure Bake	65°C-1 ou 2min ou rampe 65°C → 95°C 95°C pdt 30s		
Refroidissement des faces	10min		
Développement dans PGMEA (s)	45		
Epaisseur(μm)	1,3-4,7		
T°C départ	65°C		
Rampe ascendante	15°C/10min → 95°C 5°C/5min → 110°C		
Plateau	1h à 110°C		
Rampe descendante	5°C/5min → 95°C 15°C/10min → 65°C		

TABLE 4.3 – Tests d'amélioration du protocole de T.Robin avec ajout de cyclopentanone à la résine pour obtenir des épaisseurs <5μm et le collage de la puce. Le collage est effectué sous presse à une pression de 4 bars.

Les étapes de *soft-bake* et *post-bake* correspondent respectivement à une pré-cuisson douce juste après dépôt de la résine sur le substrat ( $\text{CaF}_2$ ) et une post-cuisson après la photolithographie pour fixer la réticulation de la résine sur le substrat avant le développement. En jouant sur les différentes étapes de cuisson nous voulions moduler la surface de la résine et augmenter sa capacité de collage. Au niveau du collage sous presse, deux problèmes se sont posés : l'inefficacité du collage et la fragilité des faces de  $\text{CaF}_2$  vis à vis de la pression exercée par la presse.

Concernant le problème de collage, différentes alternatives ont été testées (température de départ plus ou moins haute, rampe ascendante et descendante plus ou moins longues ou chauffage simple à une température donnée). Aucun protocole utilisé n'a permis d'obtenir un collage efficace. Nous avons aussi essayé de déposer une couche plus épaisse de résine ( $10\text{ }\mu\text{m}$ ) sur une seule des deux faces, la résine SU-8 ayant une bonne affinité pour les faces de  $\text{CaF}_2$  (bonne mouillabilité lors du dépôt) il nous semblait possible que l'adhésion se face sans besoin d'un contact résine-résine. Cette alternative avait pour but d'éviter la sur-cuisson de la résine qui pourrait empêcher le collage. Il est en effet assez difficile de contrôler le chauffage de couches aussi minces ( $5\text{ }\mu\text{m}$ ), de plus, à notre connaissance, les protocoles utilisés dans la littérature sont généralement fait pour des couches plus épaisses (à partir de  $10\text{ }\mu\text{m}$  et plus) pour des domaines d'applications variés [230] [231] [232] [233] [234] [235]. Les résultats obtenus n'ont pas été concluant.

Il existe néanmoins des protocoles permettant d'obtenir des cellules microfluidiques de faible épaisseur. La contrainte majeure à laquelle nous nous confrontons avec ces protocoles de fabrication est la température utilisée pour le collage et l'adhésion SU8-SU8. Le  $\text{CaF}_2$  est en effet très fragile (le moindre choc clive la face) et il nous est arrivé à de nombreuses reprises que les faces se cassent lors des (nombreuses) étapes de chauffage de ces protocoles. Nous pensons que les fractures observées lors des différentes étapes de cuisson sont dues à une différence de température entre le côté au contact de la plaque chauffante et le côté au contact avec l'air lié à l'épaisseur de la face de  $\text{CaF}_2$  ( $5\text{ mm}$ ) entraînant un choc thermique. Le protocole optimisé sur faces de verre qui nous semblait prometteur ne peut pas être étendu de manière reproductible sur des faces de  $\text{CaF}_2$  de grande dimension. Il était dans notre intérêt (pour des raisons pratiques et économiques) de trouver une alternative de collage sans presse ni changement brutal de température.

#### 4.4.1.3 Etape de collage

Une nouvelle stratégie a été élaborée pour éliminer l'étape de la presse qui provoquait régulièrement la casse des cellules de  $\text{CaF}_2$  (table 4.4). L'un des problèmes de cette étape est lié au fait que la presse utilisée était une presse à sérigraphier. Il n'était pas possible de réduire la pression sous 4 bars pour l'adapter à notre utilisation. Le collage sous presse a été remplacé par un collage dit "à froid" incluant une phase d'activation de la surface de SU-8 par traitement plasma suivit d'un rinçage  $\text{H}_2\text{O}$  [236] [237] [238]. Ces traitements permettent la formation d'une surface d'oxyde hydrophile qui change la chimie de surface et la création de liaisons hydrogènes lorsque les deux faces sont mises en contact.



Type de modification		1)Résine non réticulée	2)Activation	Observations
Résine SU-8 3005		sur une face	de la surface	
Traitement plasma des faces		1 min		Dissolution de la résine avec du PGMEA dans les canaux → impossible Surcuisson de la résine lors du passage à l'étuve
SC(rpm)		1500	5000	
Dépôt de la résine		300	200	
Accélération (rpm.s <sup>-1</sup> )		30	50	Substance des fuites
Temps (s)		95°C-3min	95°C-2min	
Soft Bake(T°C-minutes)		10 min	110-5-7s	
Refroidissement des faces		65°C-1min	65°C-1min	
Insolation (mJ.cm <sup>-2</sup> )		95°C-2min	95°C-2min	
Post Exposure Bake		180	45	
Développement dans PGMEA (s)		8,4	4,8	
Épaisseur(μm)		120°C	Activation plasma-1min	
T°C départ		-	500-1000 mtorr	
Rampe ascendante		5°C/5min → 110°C	rinçage H <sub>2</sub> O	
Plateau		1h à 120°C	séchage (azote ou tournette)	
Rampe descendante		10°C/5min → 90°C	lamineuse à froid	
Collage		étuve à 220°C, 5h-12minC		

TABLE 4.4 – Tests d'amélioration du protocole avec des techniques alternatives de collage. 1)la résine déposée sur une des deux faces n'a pas été réticulée avant collage, 2)la résine a été déposée sur une seule des faces qui a été collée à une face vierge.

Pour la mise en contact des deux faces, nous avons utilisé une lamineuse à froid (fig 4.10 B) avec l'écartement maximal autorisé, ce qui permettait d'appliquer une pression suffisante sur la puce sans décalage (grâce à une bague de centrage fabriquée dans le laboratoire de mécanique de l'ISM (fig 4.10 A)).

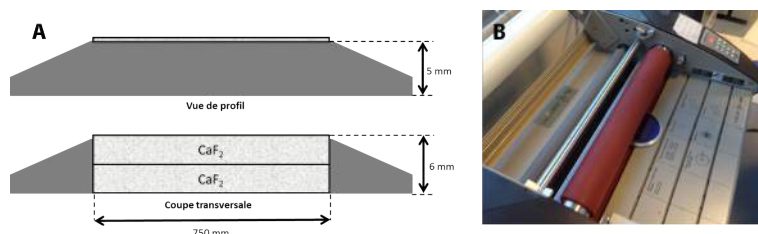


FIGURE 4.10 – A : schéma de la bague de centrage utilisé pour le collage. B : photo de la lamineuse.

Ce processus a l'avantage de se faire à température ambiante. Pour finaliser la liaison, la cellule a ensuite été mise à l'étuve à haute température pour plusieurs heures ( $250^\circ\text{C}$  pendant 5h pour une épaisseur de  $30\mu\text{m}$ ). D'autres tests ont été effectués en faisant varier le temps de cuisson. Les essais ont été infructueux, ils menaient à la sur-cuisson de la résine dans l'étuve. Il était difficile d'adapter le protocole afin d'obtenir une épaisseur inférieure à  $5\mu\text{m}$ .

Les tests effectués avec la résine SU-8 ayant été peu concluant, un nouveau protocole a été mis en place avec une colle photosensible.

#### 4.4.2 Colle photosensible

Notre choix s'est tourné vers une colle photosensible (K-PUM) qui se comporte de la même manière que la résine SU-8. Pour ces tests nous avons utilisé des faces de  $\text{CaF}_2$  d'1 mm d'épaisseur pour palier au problème de choc thermique observé avec les faces de 5mm. Nous avons aussi effectué des tests de fabrication de puces mixtes  $\text{SiO}_2/\text{CaF}_2$ .

Avec ce nouveau protocole, l'une des deux faces de la puce microfluidique est gravée chimiquement avec de l'acide fluorhydrique (HF) ce qui permet la formation des canaux. Le temps de gravure est contrôlé pour obtenir des canaux d'une profondeur de  $5\mu\text{m}$ . Sur l'autre face est déposée une fine couche ( $5\mu\text{m}$  ou moins) de colle photosensible par *spin-coating* (5000 rpm, pendant 1minute). Les deux faces sont ensuite collées par un processus classique de photolithographie avec masque négatif afin de ne réticuler que les zones visibles par le laser UV ( $\lambda=365\text{nm}$ , pendant 2 minutes). Une solution d'éthanol est ensuite injectée dans les canaux pour dissoudre la colle non réticulée se trouvant dans les canaux.

Deux problèmes se sont posés. Le premier lors de l'insolation de la puce car il faut aligner le motif du masque sur le motif gravé par HF et le second à cause de la dimension du canal. La faible épaisseur du canal empêche la bonne diffusion de l'éthanol et la surface d'interaction entre la résine et l'éthanol est trop faible pour entraîner la dissolution de la résine présente dans les canaux (fig 4.11). La surpression induite par l'injection du liquide dans les canaux bouchés provoque le décollement des faces ou une fuite au niveau des zones d'injection.

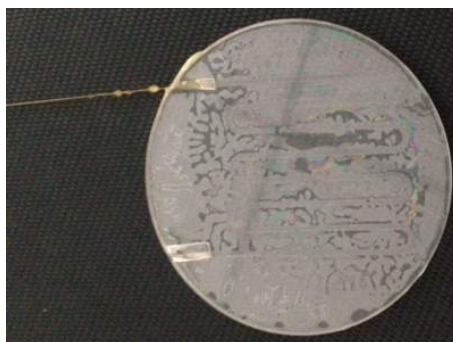


FIGURE 4.11 – Résultats obtenus avec la colle photosensible. Présence de résine dans le canal.

Le protocole implique d'utiliser de la résine SU-8 pour dessiner le motif par photolithographie et protéger la surface de la face ensuite gravée par HF. Il y a donc toujours les étapes de *soft bake* et *post-bake* qui provoquaient la fracture des faces. Malgré l'utilisation de faces de  $\text{CaF}_2$  plus fines, ces étapes ont entraîné la casse d'une face sur deux.

#### 4.4.3 Micro moulage

Nous avons testé un nouveau protocole basé sur la technique de micro-moulage [239] [227] [240]. Grâce à cette technologie, le  $\text{CaF}_2$  n'est à aucun moment du protocole chauffé à haute température (fig 4.8).

Avec ce protocole, le motif est formé par la résine est attiré autour du motif par capillarité. La vitesse de remplissage est directement proportionnelle au rayon du capillaire ainsi plus le rayon est faible plus le remplissage est rapide. Dans notre cas, l'épaisseur très faible induit d'importantes forces de frottement qui réduisent la vitesse de remplissage de manière drastique. Le remplissage complet de notre montage est observé après plus de 24h.

Nous avons suivi cette technique de micro-moulage en utilisant la résine NOA (Norland optical adhesive) comme reporté dans la littérature pour la fabrication de cellules microfluidiques pour la détection de cocaïne dans la salive humain par infrarouge [241] ou le développement de systèmes hautement performants (résistant à la pression, la déformation...) [228]. Au bout des 24h, l'ensemble est insolé sous UV afin de réticuler la résine NOA, ensuite, le PDMS est retiré, on obtient alors une face de  $\text{CaF}_2$  recouverte par notre motif en NOA. On recouvre alors la résine par notre deuxième face de NOA et on ré-insole pour celer le système. Comme l'oxygène empêche la polymérisation des radicaux libres servant à la réticulation de la résine, la perméabilité au gaz du PDMS assure le maintien d'une couche superficielle de résine ultra-fine non réticulée [242].

Dans ce protocole, les temps d'insolation sont très importants, car lors de la première exposition, la résine doit être suffisamment polymérisée pour pouvoir démouler le PDMS mais pas totalement réticulée pour pouvoir effectuer le collage de la deuxième face. Les premiers essais ont été effectués avec une résine NOA-81 (avec une viscosité de 300 centipointes). Comme les études utilisant la NOA dans la littérature mènent à la fabrication de puces microfluidiques d'épaisseurs supérieures à  $40\text{ }\mu\text{m}$  [243] [244] [241] [228] nous avons dû adapter les temps d'insolation. Les premiers essais n'ont malheureusement pas abouti.

La technologie de micro-moulage avec la résine NOA nous paraît néanmoins la plus promet-

teuse pour la fabrication de notre cellule de part sa facilité à mettre en oeuvre et l'absence de chauffage.

## 4.5 Discussion

Ces dernières années, des équipes ont pu mettre au point des cellules microfluidiques couplées à l'infrarouge [225] [226]. Polshin *et al* ont étudié la cinétique de réaction d'une enzyme, la glucose oxydase. La cellule microfluidique développée était composée d'une face en silicium et d'une face en  $\text{CaF}_2$ , le canal était formé dans une fine couche de PDMS photosensible (la WL-5150) ( $10\ \mu\text{m}$ ). Mitri *et al* ont eux utilisé deux faces de  $\text{CaF}_2$  et la résine SU-8 pour former leur cellule et observer en microscopie infrarouge les cellules MCF du cancer du sein. Le canal avait une épaisseur inférieure à  $10\ \mu\text{m}$  ( $7,5\ \mu\text{m}$ ).

Lors de cette étude, nous avons souhaité concevoir une cellule microfluidique transparente aux infrarouge. Pour ce faire, nous nous sommes inspirés de protocoles décrits dans la littérature, cependant certains aspects ne permettait pas d'adapter ces protocoles à notre système :

- la taille des substrats utilisés ( $\varnothing=7,5\text{cm}$ )
- les températures appliquées

La taille de notre cellule a été optimisée pour permettre l'observation de la cinétique d'auto-assemblage des protéines amyloïdes  $\text{A}\beta_{1-42}$ . Le motif du canal doit être appliqué sur des faces de  $\text{CaF}_2$  d'un diamètre de  $7,5\ \text{cm}$ . Les cellules décrites dans la littérature par Mitri et Polshin ont respectivement des diamètres de  $3$  et  $5,8\ \text{cm}$ . Ces différences de taille peuvent induire des difficultés dans l'étalement des différentes résines utilisées mais aussi lors du collage dues à la surface plus importante à coller et à une augmentation des points de rupture lors du collage (différences de pression).

De plus, comme nous l'avons expliqué précédemment, les faces de  $\text{CaF}_2$  sont très fragiles et ont tendance à se cliver dès qu'on les met au contact d'une source de chaleur assez importante ( $90^\circ\text{C}$ ).

Nous voulions mettre au point un procédé robuste (et économique) permettant de fabriquer des cellules microfluidiques couplées à l'infrarouge de manière systématique. Lors des tests, les étapes de chauffage ont conduit la plupart du temps à la rupture des faces. C'est pour cette raison que nous nous sommes tournés vers la technique de micro-moulage qui ne nécessite pas de mettre le  $\text{CaF}_2$  au contact d'une source chaude.

## 4.6 Conclusions

Les différents essais menés pour la conception de la cellule microfluidique couplée à l'infrarouge pour l'observation de l'auto-assemblage des protéines amyloïdes ne nous ont pas permis de résoudre les problèmes rencontrés par Mlle HaPhuong Ta lors de la première campagne d'expérimentations. Les principales difficultés auxquelles nous nous sommes confrontées étaient la présence de fuites des fluides lors de l'injection et le long du canal et la fragilité du matériau choisi (le  $\text{CaF}_2$ ) face aux protocoles de collage. Nous n'avons pas pu régler le problème de fuite le long du canal qui était directement lié au collage de la puce. Concernant le clivage des faces dès qu'elles sont au contact d'une surface chaude, les étapes du dernier protocole testé par micro-moulage avec la résine NOA ont l'avantage de se faire sans chauffage.

Nous pouvons penser à quelques améliorations du protocole par micro-moulage, notamment par une légère modification du motif du masque. La présence de "plots" au niveau des zones vides aideraient à la mise en contact du PDMS et du  $\text{CaF}_2$  et garantiraient que l'ensemble du PDMS ne se colle pas au  $\text{CaF}_2$  ce qui empêche la résine de s'infiltrer. Voici le modèle que nous proposons pour de prochains développements (fig 4.12).

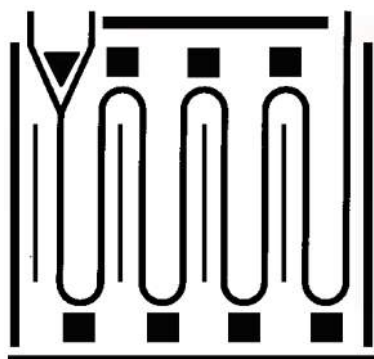


FIGURE 4.12 – Masque après optimisation pour microfabrication par micro-moulage.

On pourrait aussi penser à utiliser des substrats en silicium qui semblent plus résistants aux hautes températures et ainsi adapter le protocole de Polshin *et al* [225] qui nous paraît le plus adapté et facile à mettre en oeuvre. Le collage à froid qu'il propose pourrait résoudre les problèmes de fuites que nous avons observé.

### MESSAGE A RETENIR

- Difficultés de la conception d'une cellule microfluidique couplé à l'infrarouge liées à :
  - la fragilité du matériau choisi, le  $\text{CaF}_2$
  - la contrainte de l'épaisseur ( $<10 \mu\text{m}$ )
  - la dimension de la puce ( $\varnothing 7,5 \text{ cm}$ )
- Méthodologie à explorer avec la résine NOA

## Chapitre 5

### Dynamique d' $A_{\beta_{1-42}}$ à la résolution nanométrique



## 5.1 Introduction

Lors de notre collaboration avec l'équipe du professeur Molinari, nous avons pu avoir accès à une technologie de pointe : l'AFM-haute vitesse. Il s'agit d'une technique basée sur les mêmes principes que l'AFM classique permettant d'imager des phénomènes rapides de l'ordre du dixième de seconde. La conception de la cellule microfluidique n'ayant pas aboutie, il nous semblait intéressant de pouvoir observer les dynamiques d'assemblage d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> par le biais de l'observation de la stabilité des fibres. Cette technique permet aussi d'étudier l'interaction d'A $\beta$  avec des membranes modèles. Grâce à l'AFM haute-vitesse, nous pouvons observer l'impact des peptides sur la morphologie des membranes ainsi que l'évolution des peptides au cours du temps.

Cette technologie a été développée dans les années 2000 dans le but de remédier à la principale limitation de l'AFM : la vitesse d'acquisition. L'AFM haute-vitesse devient de plus en plus utilisée dans le milieu de la biologie car elle permet d'imager des molécules biologiques à vitesse vidéo [245]. Les études de bioimagerie se sont progressivement multipliées et couvrent maintenant de nombreux domaines [246] [247] : la dynamique de la structuration de protéines [248] [249] [250] [251] [252] [253] [254], les interactions protéine-protéine et protéine-ADN [255] [256] [257] [258], les processus de diffusion [259] [260] [261] [262], les processus moléculaires associés aux réactions enzymatiques [263] [264] [265] [266] [267] et les processus d'auto-assemblage [263] [268] [269]. L'acquisition en AFM haute-vitesse permet d'obtenir des vidéos décrivant la dynamique structurale d'échantillons biologiques aidant à la meilleure compréhension de processus cinétiques engagés à l'échelle nanométrique, en milieu physiologique. Il n'existe à notre connaissance, aucune étude concernant l'interaction d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> avec des membranes.

Les mêmes compositions lipidiques que celles utilisées avec le nano-IR ont été utilisées : GM1/Chol/SM/PC (40/20/20/20), Chol/ SM/PC (20/20/60) et SM/PC (20/80). Un nouveau mélange GM1/SM/PC (40/20/40) a été testé. Nous avons choisi de nous concentrer sur deux des peptides utilisés précédemment : WT et oligomère G37C (oG37C). Ces peptides ont été choisis car selon les études qui ont été menées auparavant et nos hypothèses, ils pourraient être représentatifs de deux différents processus d'auto-assemblage *on-pathway* pour WT et *off-pathway* pour oG37C se traduisant par une plus grande toxicité [5] [270] et donc nous permettre d'évaluer les différences d'interaction dues à ces différences d'auto-assemblage. Les tests d'interaction ont été effectués sur des bicouches déposées sur une surface de mica fraîchement clivée, les différents peptides ont ensuite été directement injectés dans la cellule de l'AFM haute-vitesse en maintenant l'acquisition. Ce protocole nous a permis d'obtenir les dynamiques d'interaction d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> avec différents modèles lipidiques à partir de l'injection sans temps de latence dû à l'expérimentation.

## 5.2 Dynamique de l'interaction A $\beta$ -bicouche lipidique

### 5.2.1 Principe de l'AFM haute vitesse, *High-speed AFM* (HS-AFM)

L'AFM haute-vitesse permet de répondre à toutes les conditions pour l'observation d'échantillons biologiques : 1) imagerie en milieu liquide, 2) haute résolution spatiale, 3) haute résolution



temporelle, 4) imagerie direct sans marqueurs et 5) technique faiblement invasive [245] [247]. L'AFM haute-vitesse permet l'imagerie de molécules individuelles dans des conditions physiologiques et de manière dynamique avec une vitesse de 25 images par seconde [263] [246] (plus de détails en annexe). Cette technique récente donne accès à la dynamique des changements morphologiques se produisant lors d'une interaction, nous avons alors étudié l'interaction d'A $\beta_{1-42}$  avec des bicouches lipidiques. Les résultats ont été obtenus au laboratoire LRN (Laboratoire de Recherche en Nanosciences) sous l'expertise de Maxime Ewald et du professeur Michael Molinari.

### 5.2.2 Morphologie et dynamique des peptides d'A $\beta_{1-42}$

Nous avons dans un premier temps observé les peptides seuls pour avoir une idée de leur taille, leur morphologie et leur dynamique sous leur forme agrégée. Au bout de 7 jours d'incubation à 37°C sous agitation, on observe que l'oligomère G37C a formé des agrégats. Certains de ces agrégats se prolongent par des tubules. Ces agrégats ont une longueur d'environ 200 nm et une largeur de 50 nm. Autour de ces agrégats on peut observer la présence d'espèces plus petites (environ 10 nm), sphériques, très mobiles et dynamiques il s'agit d'après nos observations d'espèces oligomériques (fig 5.1, flèches noires). Ces observations sont en accord avec d'autres études effectuées sur des amyloïdes [271] et sur A $\beta_{1-40}$  et A $\beta_{1-42}$  [272] [273]. Yusko *et al* ont observé par microscopie électronique des protofibrilles de longueurs comprises entre 6,1 et 10,3 nm et de diamètres compris entre 5 et 7,3 nm. Chang *et al* ont montré que des espèces oligomériques sphériques avaient une taille comprise entre 6 et 20 nm avec une majorité se situant entre 12 et 15 nm. Les vidéos obtenues montrent que certains oligomères dynamiques viennent au contact et s'accrochent aux agrégats pendant que d'autres s'en séparent (fig 5.1 flèches blanches). Il apparaît comme une dynamique d'interaction entre les espèces oligomériques et les plus grands assemblages sans que ces derniers n'augmentent en taille. Ces résultats sont en accord avec les résultats précédents, démontrant que l'oligomère G37C ne forme pas de fibres.

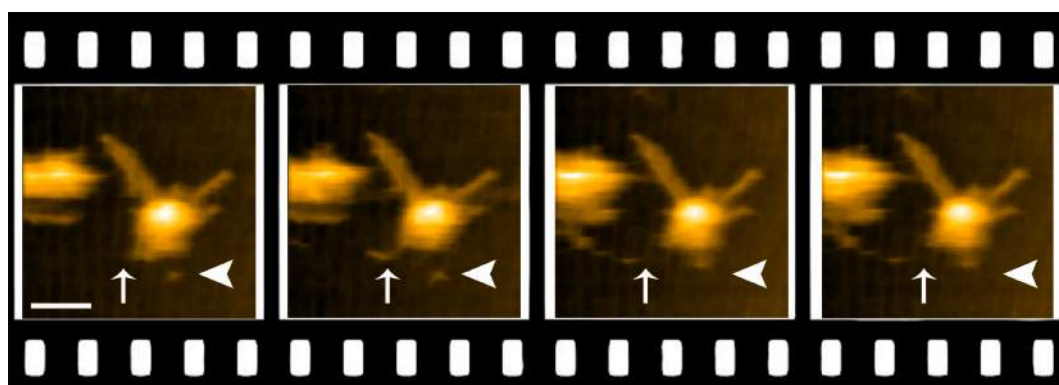


FIGURE 5.1 – Images d'AFM des agrégats de l'oligomère G37C (temps entre la première et la dernière image = 1,68s). Les flèches blanches pointent la dynamique de détachement des oligomères accrochés aux agrégats. Les têtes de flèches blanches correspondent à un oligomère. Vitesse d'acquisition des images : 4,76 images par secondes, taille des images : 200×200 nm<sup>2</sup>. La barre d'échelle (en blanc) correspond à 50 nm.

Au même temps d'incubation, le monomère WT a une morphologie totalement différente avec la présence de nombreuses fibres. On peut trouver des fibres isolées (fig 5.2, flèche blanche)

mais la plupart du temps on observe des "paquets" de fibres enroulées les unes aux autres (fig 5.2, têtes de flèches blanches).

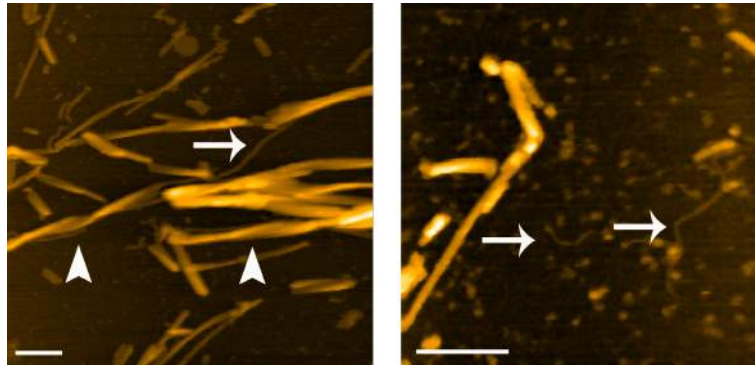


FIGURE 5.2 – Images d'AFM des fibres WT obtenues après 7 jours d'incubation à 37°C sous agitation. L'image de gauche montre les "paquets" de fibres (têtes de flèches blanches) et l'image de gauche la présence de fibres uniques (flèches blanches). Taille des images :  $400 \times 400 \text{ nm}^2$  et  $200 \times 200 \text{ nm}^2$  respectivement à gauche et à droite. La barre d'échelle (en blanc) correspond à 50 nm.

On observe également de petites espèces sphériques (fig 5.3, flèche blanche) qui semblent s'accrocher à de petites fibres pour en former de plus longues (fig 5.3, tracé rouge). Ce processus est très dynamique, les fibres formées à ce moment là changent très rapidement de morphologie alors que les fibres déjà formées au moment de l'observation sont plutôt statiques et ne semblent pas se modifier au cours du temps. D'après ces résultats, on peut supposer qu'il existe un équilibre dans la formation des fibres qui, une fois une certaine taille atteinte, ne sont plus modifiées même dans un environnement où des espèces plus petites sont capables de s'auto-assembler.

Les résultats obtenus avec les fibres d'A $\beta_{1-42}$  concordent avec plusieurs études du mécanisme de formation des amyloïdes. La formation des fibres amyloïdes implique au moins deux étapes : la formation de centre de croissance, les noyaux de nucléation, par nucléation primaire, étape suivie par l'élongation en fibres par addition de monomères [274] [62] [275] [276]. Certains auteurs proposent que l'élongation des fibres d'A $\beta$  se produirait via une cinétique de "*stop-and-go*" : soit la fibre est dans un état dans lequel la croissance est autorisée soit la fibre est dans un état dans lequel elle ne peut pas croître [277]. L'un ou l'autre de ces états est déterminé par la conformation du dernier monomère à s'être attaché à la fibre qui, dû à un changement structural, ne présente plus la matrice nécessaire pour que d'autres monomères puissent se lier à la fibre formée. Il doit alors y avoir modification de l'extrémité de la fibre soit par dissociation de ce monomère, soit par sa réorganisation pour que la fibrillation reprenne [278] [279] [280]. Ces études montrent aussi qu'une protéine est capable de former des fibres avec différentes morphologies et que ces dernières peuvent adopter plusieurs vitesses d'élongation. D'autres études établissent que le mécanisme d'élongation des fibres serait suivi par un second processus, appelé nucléation secondaire, qui conduirait à l'augmentation du nombre de fibres. Ce processus est provoqué par une deuxième nucléation qui apparaît sur les fibres déjà existantes augmentant donc la quantité d'"extrémité" de fibres auxquelles peuvent se lier les monomères et ainsi augmenter la vitesse de fibrillation. Une fois que le centre de nucléation secondaire est suffisamment grand, la fibre "mère" se fragmente pour en former deux. La probabilité d'une fibre à se fragmenter dépend de la taille de la fibre et

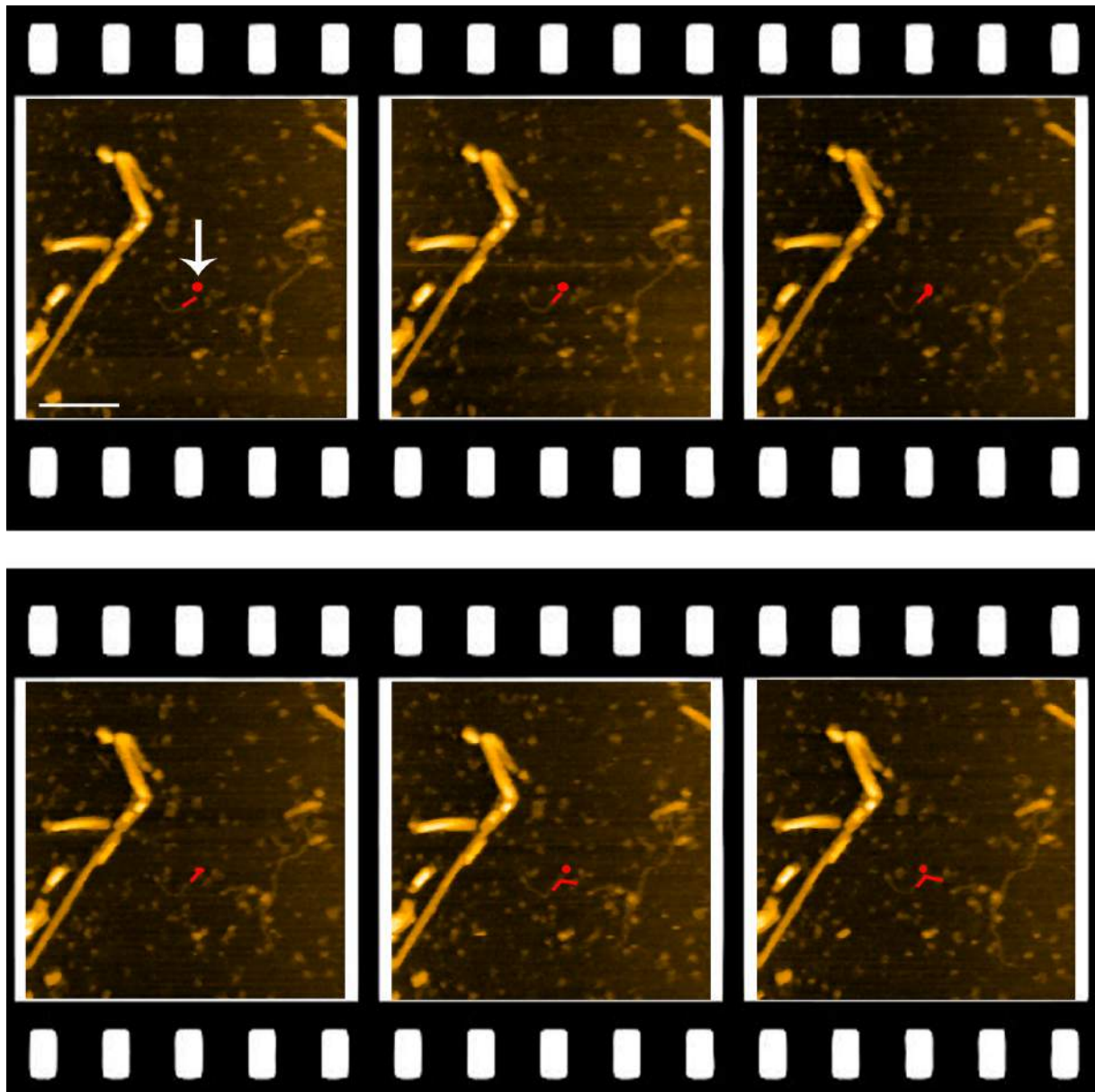


FIGURE 5.3 – Images d'AFM des fibres WT obtenues après 7 jours d'incubation à 37°C sous agitation au cours du temps (temps entre la première et la dernière image = 1,9s). Le point rouge marque la présence d'un oligomère (flèche blanche) et les barres rouges celles d'une fibre unique. Vitesse d'acquisition des images : 4,8 images par secondes, taille des images : 400×400 nm<sup>2</sup>. La barre d'échelle (en blanc) correspond à 100 nm.

de la position de la nucléation sur la fibre [281] [280] [282] [276]. Voici le mécanisme proposé par Cohen *et al* (fig 5.4) :

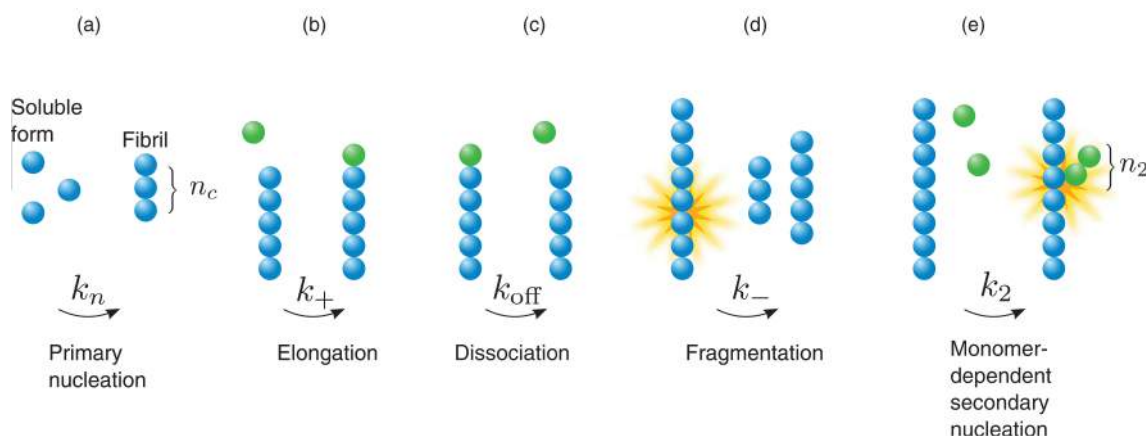


FIGURE 5.4 – Schéma illustrant le mécanisme de formation des amyloïdes proposé par Cohen *et al* [276].

Ces données correspondent à ce que nous avons pu observer en microscopie AFM haute-vitesse avec des espèces de petite taille (monomère ou oligomère) capables d'une part de venir se lier aux protofibrilles présentes en solution et d'autre part de s'en détacher (fig 5.3, tracé rouge). Nous n'avons néanmoins pas observé le phénomène de seconde nucléation, qui est un processus long. Dans l'échantillon de WT nous avons aussi observé des fibres matures longues, ne montrant pas, au moins pour la durée de la vidéo, de dynamique d'auto-assemblage ce qui corrobore une hétérogénéité de vitesse de fibrillation au sein d'une protéine.

D'autre part, nous avons effectué des mesures sur l'oligomère G37C (fig 5.1) fraîchement décongelé pour évaluer la taille des objets que nous utiliserons par la suite pour l'étude de son interaction avec les bicouches lipidiques. Les observations de l'échantillon montrent une population très homogène d'espèces sphériques d'environ 10 nm ce qui est en accord avec les oligomères non agrégés. Ces espèces sont très mobiles et nous n'avons pas observé de zones avec des agrégats ce qui démontre l'homogénéité et la stabilité des échantillons récoltés après purification. Nous sommes donc en mesure d'affirmer que les espèces injectées sont contrôlées et que nous observons l'interaction d'oligomères et de monomères avec des bicouches lipidiques et non d'espèces agrégées.

### 5.2.3 Protocole de formation des bicouches lipidiques

Avant de pouvoir tester les interactions lipide/peptide, nous avons établi un protocole de formation des bicouches sur le support échantillon de l'AFM haute-vitesse. A cause de la complexité de certaines compositions lipidiques, deux protocoles ont été appliqués. Pour les compositions SM/PC et Chol/SM/PC des SUV formées au préalable sont éclatées sur le mica fraîchement clivé, après 5 minutes d'incubation l'échantillon est rincé (tampon A) et observé (fig 5.5).

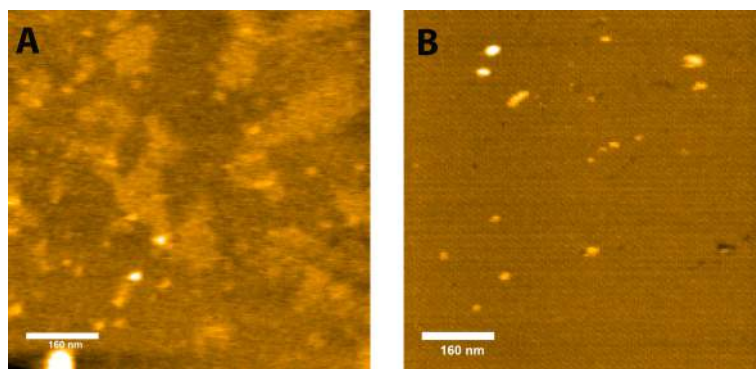


FIGURE 5.5 – Images d'AFM des dépôts : A) SM/PC (20/80) et B) Chol/SM/PC (20/20/60). Tailles des images 400×400 nm<sup>2</sup>. La barre d'échelle (en blanc) correspond à 160 nm.

Pour la composition Chol/SM/PC nous obtenons des bicouches homogènes mais le mélange SM/PC induisent la formation de domaines lipidiques légèrement plus épais répartis de manière homogène sur toute la surface. On peut néanmoins trouver quelques lacunes observables en noire sur les images, qui nous permettent d'établir avec certitude l'épaisseur de la couche lipidique (table 5.1). Pour les deux compositions nous avons obtenu une épaisseur de 8 nm correspondant à une double bicouche.

Épaisseur de la couche lipidique (nm)			
GM1/Chol/SM/PC	SM/PC	Chol/SM/PC	GM1/SM/PC
17±2, 71	9,9±1, 6	6,1±1, 6	36,1±4, 5

TABLE 5.1 – Épaisseurs en nanomètre des différentes couches lipidiques GM1/Chol/SM/PC, SM/PC, Chol/SM/PC et GM1/SM/PC. Les résultats obtenus correspondent à la moyenne de plusieurs mesures effectuées sur les bicouches utilisées pour les tests d'interaction.

Dans le cas de GM1/Chol/SM/PC et GM1/SM/PC les bicouches ont été obtenues avec d'avantage de difficultés. Les problèmes rencontrés étaient sûrement dus à la complexité de la composition qui entraînait la formation de micro-domaines comme nous l'avons vu précédemment avec les expériences de nano-IR. Pour ces deux cas nous n'avons pas pu former de bicouche par éclatement de SUV, nous avons du utiliser des LUV que nous avons laissé sécher après dépôt à température ambiante. Une fois totalement sèches, les couches lipidiques ont directement pu être réhydratées et observées. Les résultats montrent cette fois-ci des couches parfaitement homogènes sans apparents domaines lipidiques (fig 5.6).

On remarque sur les images la présence de petites particules identifiées comme étant des éléments lipidiques non éclatés dont la taille est inférieure à 30 nm. Pour mesurer l'épaisseur de la couche formée nous avons choisi de nous positionner sur des rebords (la couche lipidique ne recouvrant pas intégralement le porte échantillon). Comme attendu, les couches formées cette fois-ci sont beaucoup plus épaisses (table 5.1) ce qui est du au fait d'utiliser des liposomes mais aussi de ne pas rincer la couche avant observation. Les résultats montrent des couches d'environ 17 nm pour la composition GM1/Chol/SM/PC et d'environ 36 nm pour la couche GM1/SM/PC. Par une caractérisation postérieure par DLS, nous avons obtenu pour GM1/Chol/SM/PC une

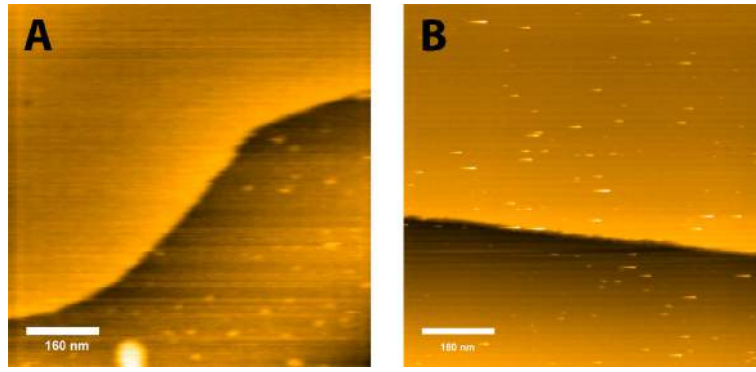


FIGURE 5.6 – Images d'AFM des dépôts : A) GM1/Chol/SM/PC (40/20/20/20) et B) GM1/SM/PC (40/20/40). Tailles des images 400×400 nm<sup>2</sup>. La barre d'échelle (en blanc) correspond à 160 nm.

solution composé pour moitié de MLV (*Multi Lamellar Vesicle*) pour moitié de liposomes d'une taille moyenne autour de 180 nm alors que les solution de GM1/SM/PC ne formaient que des MLV.

Dans le chapitre précédent, nous avons établi que le mélange de certains des lipides utilisés pouvaient engendrer la formation de domaines lipidiques [206] [193]. Plus précisément, pour chacune des compositions nous avons observé des organisations lipidiques différentes comme reportées dans la littérature. Dans les bicouches composées de sphingomyéline et POPC, il y a formation de domaines de SM de taille nanométrique dans la matrice de POPC [283], ces observations correspondent aux résultats de microscopie AFM haute-vitesse.

Lorsque qu'on ajoute du cholestérol, il a tendance à s'associer à la sphingomyéline pour former des domaines de plus grande taille [283] [284]. Selon la quantité de cholestérol ajouté on pourra soit observer la présence de petits domaines ou être face à de grandes zones uniformes supérieures à 1  $\mu$ m [285] [286]. Dans notre cas, avec 20 % de cholestérol, les domaines formés avec la sphingomyéline sont de grandes zones homogènes supérieures au micromètre. Certains auteurs reportent aussi que l'ajout de cholestérol conduirait à la diminution de la hauteur des domaines Chol/SM par rapport à la matrice de POPC. Si la différence entre les deux phases est trop faible, alors la pointe AFM pourrait ne pas faire la différence et donc nous observerions dans ce cas aussi une couche uniforme [287].

Pour le cas des mélanges avec le GM1, l'organisation au sein des bicouches dépend là encore de la quantité de gangliosides utilisés, mais tous les auteurs s'accordent sur le fait que les GM1 seront localisés dans les phases condensées (*Lo phases*) de sphingomyéline ou sphingomyéline/Cholestérol [283] [284] [288] [289] [290]. D'après Puff *et al*, pour une concentration supérieure à 1%, les GM1 empêchent la formation des domaines en phase liquide ordonnée (*Lo phase*) d'une taille de l'ordre du micromètre et mènent à une séparation de phase formant des domaines à l'échelle du nanomètre [288] [291]. De plus, le cholestérol est connu pour interagir avec les gangliosides et modifier leur conformation les rendant plus ou moins accessibles. Lors de nos observations, nous avons obtenu des couches très homogènes (sans domaines apparents) pour les mélanges contenant des GM1 contrairement à ce que reporte la littérature. Nous pouvons expliquer cette différence soit parce que les nano-domaines formés ne présentent pas une

différence de hauteur suffisante pour être détectée par la pointe AFM, soit parce qu'en présence de multicouches l'organisation globale est modifiée.

Pour certaines expériences, nous n'avons pas réussi à obtenir de bicouches tout à fait homogènes, les échantillons présentaient de grosses lacunes réparties sur toute la surface qu'entouraient de large îlots de lipides. Ces échantillons ont tout de même été utilisés pour nos tests d'interaction et nous avons, pour chaque bicouche formée, balayé l'échantillon pendant au moins 20 minutes afin d'en tester la stabilité. Les bicouches n'ont montré aucun changement morphologique au cours du temps lorsqu'elle étaient observées seules. Nous avons alors pu injecter les différents peptides dans la cellule fluide tout en maintenant l'acquisition vidéo ce qui nous permet d'avoir le T0 de l'interaction et d'en établir une cinétique précise. Les deux peptides WT et oG37C ont été testés avec les compositions lipidiques suivantes : GM1/Chol/SM/PC (40/20/20/20), SM/PC (20/80), GM1/SM/PC (40/20/40) et Chol/SM/PC(20/20/60).

## 5.2.4 Résultats

### 5.2.4.1 Effet d'A $\beta_{1-42}$ et de oG37C sur des dépôts lipidiques contenant GM1 et Cholestérol

Nous avons en premier étudié le mélange complexe GM1/Chol/SM/PC. Des effets similaires ont été obtenus avec l'addition de WT et oG37C sur la couche lipidique. Dans les deux cas au bout d'un faible temps de latence (environ 50 secondes pour les deux peptides), la bicouche commence à être détruite par les peptides ce qui se traduit localement par la formation de lacunes, aboutissant à la destruction complète de la bicouche. La destruction complète se produit deux fois plus rapidement dans le cas de l'oligomère G37C que du WT, respectivement à 100 secondes et à 220 secondes. En présence de l'oligomère G37C la destruction de la bicouche est quasiment instantanée après le temps de latence. Les images extraites du film montrent que l'accroche du peptide semble se faire au bord du dépôt lipidique et une solubilisation très rapide de ce dernier se produit (fig 5.7).



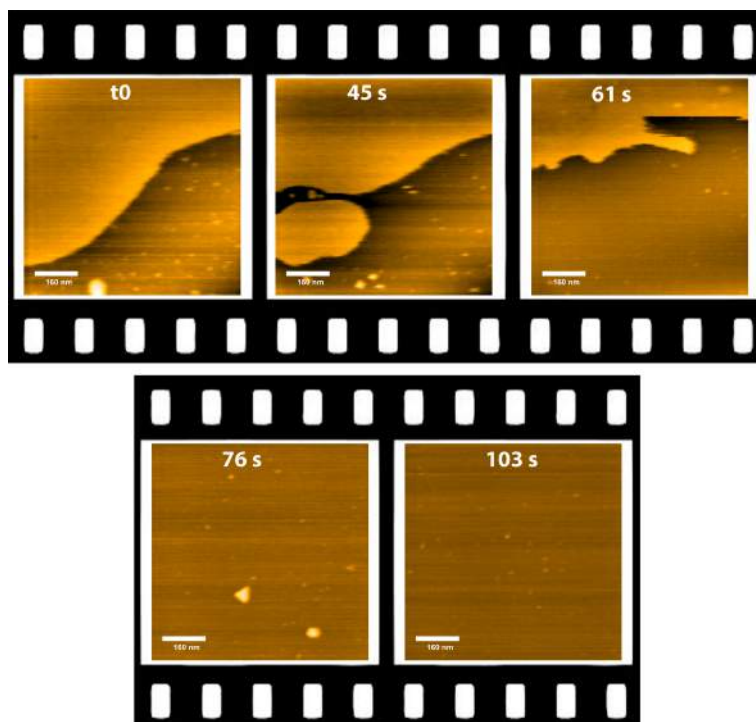


FIGURE 5.7 – Images d'AFM de l'interaction de l'oligomère G37C avec un dépôt lipidique de GM1/Chol/SM/PC (40/20/20/20). Tailles des images  $400 \times 400 \text{ nm}^2$ . La barre d'échelle (en blanc) correspond à 160 nm.

Avec WT (fig 5.8), la solubilisation du dépôt lipidique est beaucoup plus progressive : des trous sont formés et les lacunes déjà existantes sont agrandies jusqu'à ce qu'il ne reste plus que des îlots de lipides que l'on peut voir se dissoudre progressivement. Dans les deux cas on peut supposer que les lipides qui composaient les bicouches ont été solubilisés par les peptides. Ces résultats montrent que l'oligomère G37C interagit avec les membranes contenant des GM1 et du cholestérol plus efficacement que le monomère WT. Les lacunes qui étaient présentes à l'origine créent un point d'attaque des peptides, néanmoins, il est important de noter que ces lacunes ne sont pas à l'origine d'une faiblesse de la couche lipidique. Nous avons observé, malgré les défauts présents à chaque fois, des différences d'interaction entre les différentes bicouches et nos peptides écartant tout artefact de mesure.



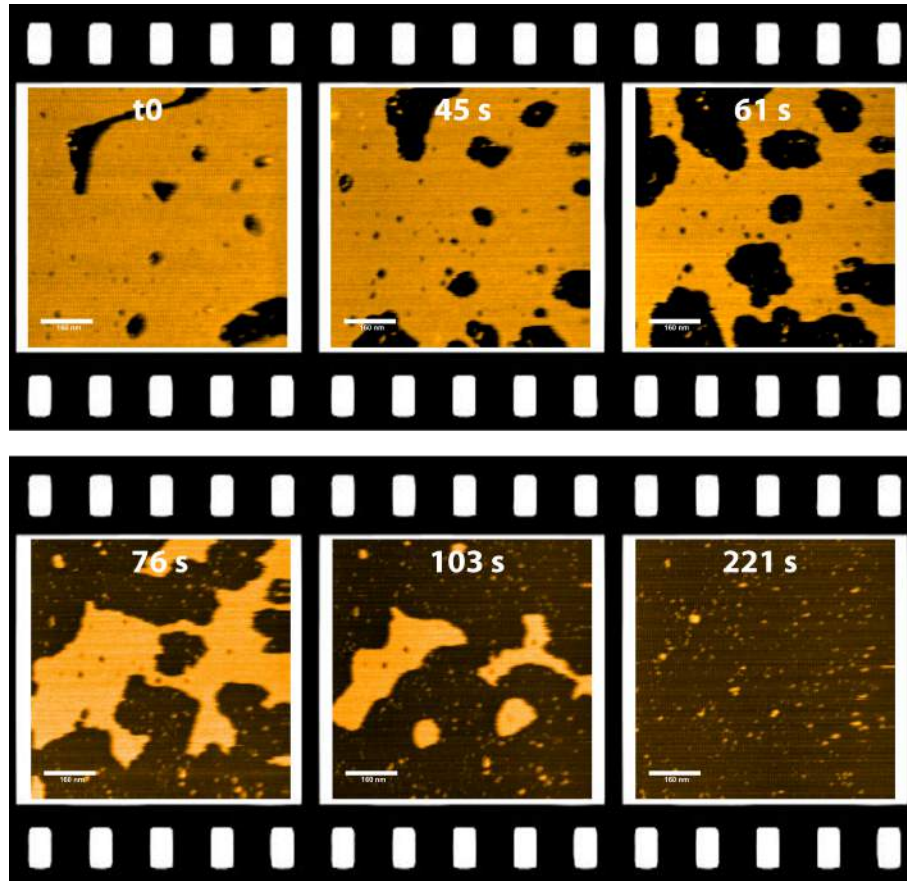


FIGURE 5.8 – Images d'AFM de l'interaction d'A $\beta_{1-42}$  WT avec un dépôt de GM1/Chol/SM/PC (40/20/20/20). Tailles des images 400×400 nm<sup>2</sup>. La barre d'échelle (en blanc) correspond à 160 nm.

Afin de vérifier que l'interaction observée précédemment est bien due à la présence des GM1 et du cholestérol, les mêmes expériences ont été effectuées avec notre témoin négatif SM/PC. Les expériences ont été menées dans les mêmes conditions que précédemment. Cette fois-ci, malgré une observation beaucoup plus longue (environ 20 minutes après injection des peptides) aucune modification des bicouches n'est mise en évidence (fig 5.9). Les peptides ne semblent pas interagir avec les bicouches de SM/PC, en revanche, on observe leur accumulation sur le mica dans les lacunes des bicouches.

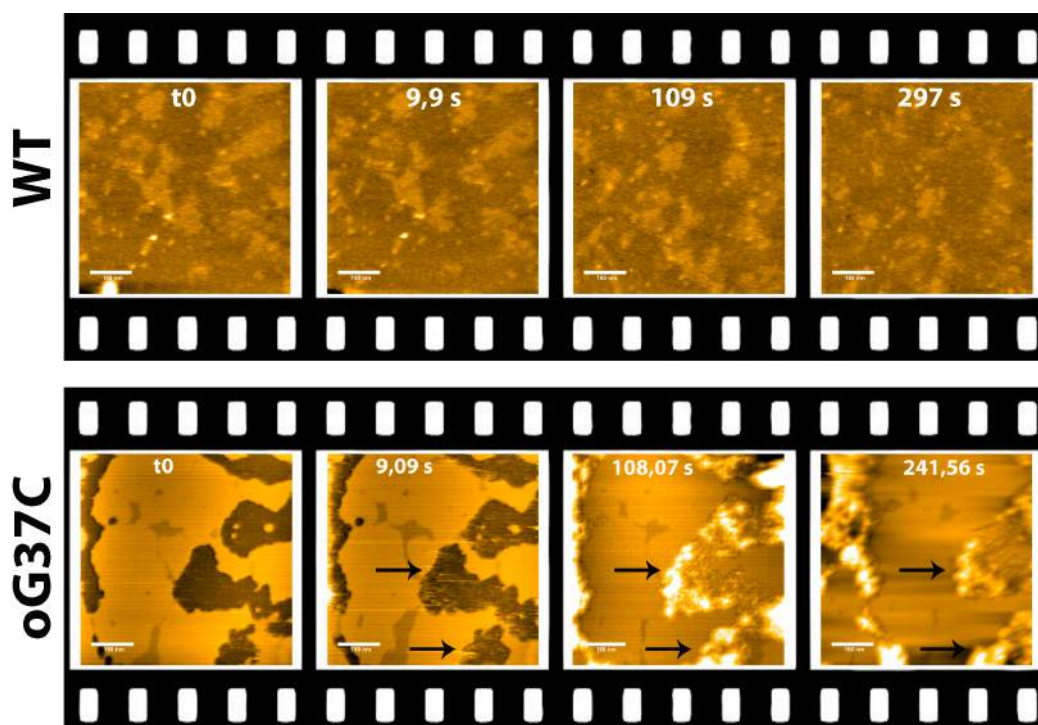


FIGURE 5.9 – Images d’AFM de l’interaction des peptides WT (haut) et oG37C (bas) avec un dépôt de SM/PC (20/80). Tailles des images 400×400 nm<sup>2</sup>. La barre d’échelle (en blanc) correspond à 160 nm.

Au cours du temps, les lacunes qui étaient apparues lors de la formation de la bicouche sont comblées par les peptides. Là encore WT et oG37C adoptent le même comportement mais WT agit moins rapidement que oG37C et apparemment moins de peptides s’accumulent dans les trous. Avec l’oligomère G37C, l’apparition des peptides dans les lacunes de la bicouche est quasiment immédiate et surtout très importante ; les peptides créent des amas très épais (fig 5.9, flèches noires).

Ces résultats nous indiquent que les GM1 et/ou le cholestérol jouaient un rôle pour l’interaction d’A $\beta$  avec des membranes. Dans le but d’établir un mécanisme d’interaction, les expériences ont été répétées avec des bicouches contenant uniquement soit du cholestérol soit des GM1.

#### 5.2.4.2 Rôle des gangliosides et du Cholestérol dans le mécanisme d’interaction

Comme décrit précédemment, le dépôt de Chol/SM/PC est très homogène. Les points plus lumineux présent à la surface du dépôt ont été identifiés comme étant des éléments lipidiques non éclatés dont la taille est inférieure à 30 nm

Lors de l’interaction d’A $\beta_{1-42}$  (WT et oG37C) avec les bicouches contenant uniquement du cholestérol (Chol/SM/PC) aucun changement de morphologie n’a été observé au niveau des dépôts lipidiques et les peptides n’ont pas été détecté malgré une observation longue (20 minutes). Les peptides injectés dans la cuve ne semblent pas venir au contact de la bicouche comme l’attestent les images, extraites du film, de la bicouche seule et de la bicouche après injection du peptide (fig 5.10).

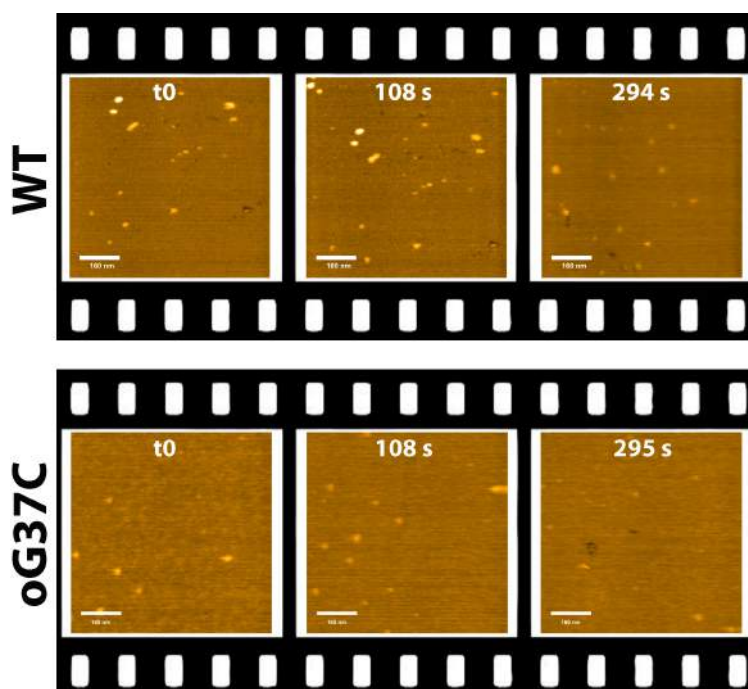


FIGURE 5.10 – Images d'AFM de l'interaction des peptides WT (haut) et oG37C (bas) avec un dépôt de Chol/SM/PC (20/20/60). Tailles des images  $400 \times 400 \text{ nm}^2$ . La barre d'échelle (en blanc) correspond à 160 nm.

Dans le cas d'oG37C, on peut observer, au bout d'environ 20 minutes, dans les lacunes, la présence de quelques espèces sphériques qui pourraient être des oligomères (fig 5.11, flèches noires). On se rapproche du comportement que les peptides avaient eu en présence de notre composition témoin SM/PC. Les résultats montrent que la présence seule du cholestérol n'est pas suffisante pour induire une interaction des peptide d'A $\beta_{1-42}$  avec les membranes.

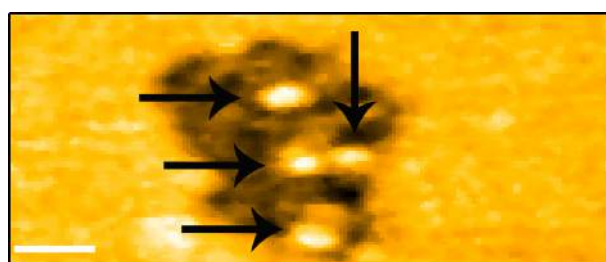


FIGURE 5.11 – Images d'AFM de l'interaction des peptides oG37C (bas) avec un dépôt de Chol/SM/PC (20/20/60). Agrandissement sur une lacune et observation des oligomères se trouvant dans la lacune. Tailles des images  $150 \times 80 \text{ nm}^2$ . La barre d'échelle (en blanc) correspond à 20 nm.

L'interaction avec les bicouches contenant uniquement des gangliosides GM1 ne révèle pas de changement de morphologie de la couche lipidique. Mais ici, contrairement au mélange précédent Chol/SM/PC, au cours du temps, les peptides viennent s'accumuler à la surface du dépôt lipidique (fig 5.12).

On peut aussi les observer au niveau de la zone sans lipide. Les peptides observés ont une taille moyenne de 10 nm (fig 5.12, flèches noires) correspondant à des espèces oligomériques,

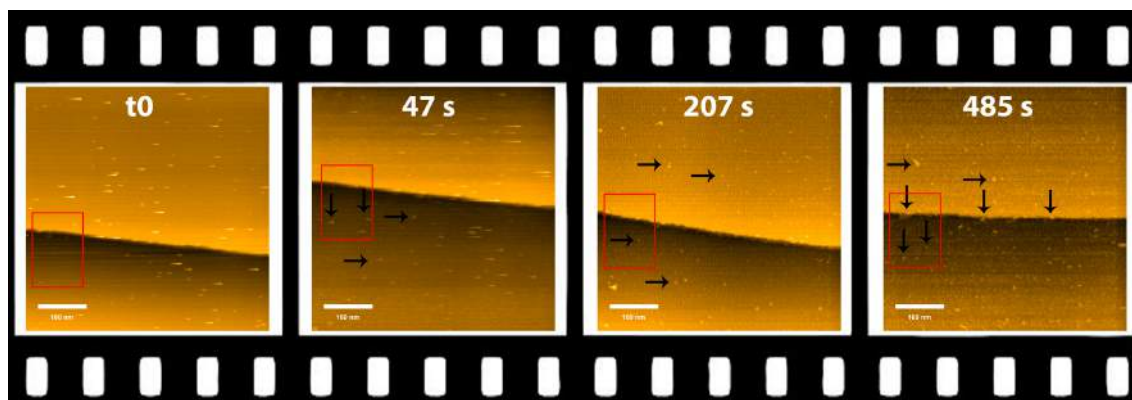


FIGURE 5.12 – Images d'AFM de l'interaction des peptides WT (haut) et oG37C (bas) avec un dépôt de GM1/SM/PC (20/20/60). Tailles des images 400×400 nm<sup>2</sup>. La barre d'échelle (en blanc) correspond à 160 nm.

oG37C reste donc stable au cours du temps alors que WT commence à s'auto-assembler et à former des espèces intermédiaires qui interagissent avec les bicouches. Les peptides WT et oG37C semblent avoir une certaine affinité pour les gangliosides.

### 5.2.5 Discussion

Au vu des résultats, nous pouvons avancer l'hypothèse que les GM1 servent de point d'accroche à A $\beta$  : les gangliosides sont nécessaires à l'interaction d'A $\beta_{1-42}$  avec les membranes comme démontré par Ikeda *et al* [165].

Dans la littérature il est établi qu'A $\beta$  se lie aux membranes en présence de GM1, le peptide interagit de manière sélective avec les gangliosides présent dans les membranes [140] [292]. Cette interaction est conditionnée par la structure qu'adopte GM1 dans la membrane. Les équipes de Matsuzaki et Glabe ont démontrés qu'il n'y avait interaction que lorsque le GM1 est présent sous forme de "radeaux", si le GM1 est réparti de manière homogène dans la bicouche alors il n'y aura pas d'interaction avec les peptides A $\beta$  [175] [293]. Les radeaux lipidiques de GM1 servent de catalyseur d'un changement conformationnel générant une forme active d'A $\beta$  à la membrane avec des capacités d'essaimage pour la formation d'oligomères immédiatement après liaison avec la membrane qui a lieu en environ 1 minute [194]. Nous avons lors de nos expériences observé le même ordre de temps d'interaction, environ 60 secondes.

La littérature rapporte un rôle coopératif du cholestérol et des gangliosides GM1 lors de l'interaction d'A $\beta$  avec des membranes [294]. Le cholestérol en partenariat avec les sphingolipides, aurait pour rôle d'améliorer l'accessibilité des gangliosides en changeant leur conformation : il permet d'établir un réseau de liaisons hydrogènes entre les groupements -OH du cholestérol, les groupements -NH des sphingolipides et les atomes d'oxygènes des têtes polaires des gangliosides [295] [127]. Le cholestérol (phospholipide/SM/Cholestérol) aurait un rôle protecteur sur la membrane à haute concentration (20%) en déclenchant au sein de la membrane la transition de la phase gel (L $\beta$ ) de la sphingomyéline dans la matrice de phospholipides vers une phase liquide ordonnée (Lo) Cholestérol/sphingomyéline. Les peptides d'A $\beta_{1-42}$  n'altèrent pas les phases ordonnées des membranes [296], de plus, Manna *et al* ont montré qu'il n'existait pas d'interaction

directe entre le cholestérol et A $\beta$  [297]. Le cholestérol accélère l'interaction entre A $\beta$  et les GM1 mais n'a aucun impact sur l'affinité du peptide pour les récepteurs des gangliosides, l'interaction d'A $\beta$  avec les GM1 est cholestérol dépendant [127] [297].

Les expériences menées en AFM haute-vitesse avec les dépôts GM1/Chol/SM/PC mettent en évidence l'importance des GM1 et du cholestérol dans l'interaction des peptides d'A $\beta_{1-42}$ . Nous avons pu montrer qu'en l'absence de ces deux éléments, les bicouches lipidiques ne sont pas du tout impactées par A $\beta$ , mais en revanche les peptides sont capables de s'accumuler à leur proche contact. Ces résultats peuvent être corrélés à l'accumulation non spécifique mise en évidence en PWR dans la première étude avec les bicouches composées à 100% de DOPC et avec la littérature [140]. Les résultats obtenus avec les dépôts de Chol/SM/PC et GM1/SM/PC montrent qu'A $\beta$  présente une affinité pour les gangliosides GM1 présents dans les membranes mais que cette affinité n'est pas suffisante pour induire la destruction de la membrane. Nous avons aussi pu observer que, lorsqu'il est présent seul dans les membranes, le cholestérol ne favorise pas l'interaction d'A $\beta$  avec celles-ci. Ces résultats sont en accord avec ceux reportés dans la littérature sur le rôle des GM1 et du cholestérol.

D'autre part, même si les deux peptides (WT et oG37C) adoptent le même type de comportement, l'interaction de l'oligomère G37C avec les dépôts lipidiques contenant des GM1 et du cholestérol est deux fois plus rapide que dans le cas du monomère WT. La destruction totale de la membrane est atteinte pour oG37C et WT respectivement en 100 et 200 secondes. Cette différence peut s'expliquer car oG37C est déjà sous sa forme oligomérique stable connu pour être l'espèce interagissante alors que monomère WT doit tout d'abord s'auto-assembler pour former ces oligomères avant de pouvoir interagir avec les lipides.

D'après di Scala *et al* [298], les espèces monomériques d'A $\beta$  pénètrent d'abord dans la membrane plasmique suivie par l'oligomérisation qui se produit sous contrôle du cholestérol. Il y a insertion d'A $\beta$  via les domaines riches en cholestérol plus fluides [299] [298] et ce sont ensuite les GM1 qui stabilisent les intermédiaires d'A $\beta$  (oligomères, protofibrilles) par le biais de liaisons hydrogènes, groupements chargés et des groupements -CH hydrophobes des sucres [194]. GM1 forme un complexe avec A $\beta$  qui agit comme un modèle et accélère la formation d'oligomères toxiques [300] et/ou de fibrilles. De plus, les oligomères d'A $\beta$  formé ont eux aussi la capacité d'interagir avec les GM1 présents dans les membranes [301]. Tous ces résultats sont en parfait accord avec les résultats obtenus lors de l'interaction entre A $\beta_{1-42}$  et les dépôts lipidiques GM1/SM/PC avec l'accumulation des peptides sur la membrane, sous forme d'oligomères (oG37C) et aussi par formation d'oligomères dans le cas de WT.

## 5.3 Conclusions

Dans ce chapitre nous avons mis en évidence la dynamique et la morphologie de l'interaction entre  $A\beta_{1-42}$  et des modèles membranaires de composition lipidique proche des membranes neuronales avec une technique innovante : l'AFM haute-vitesse. Cette étude nous a dans un premier temps permis d'établir la cinétique d'interaction avec des couches lipidiques et dans un second temps apporté des informations sur le mécanisme d'interaction. L'étude des amyloïdes est complexe car elle met en jeu deux processus opérant en parallèle : l'auto-assemblage et l'interaction avec des membranes. Grâce à l'AFM-haute vitesse nous avons pu caractériser l'ensemble de ces phénomènes en temps réel, à vitesse vidéo.

Nous avons observé l'interaction de deux peptides, WT et oG37C avec quatre compositions lipidiques : GM1/Chol/SM/PC, Chol/SM/PC, GM1/SM/PC et SM/PC. Nous avons montré que les gangliosides GM1 et le cholestérol sont nécessaires pour que l'interaction d' $A\beta_{1-42}$  induise la destruction des membranes. Les résultats ont aussi révélé que le mécanisme d'interaction comporte une première phase de liaison des peptides à la membrane par les GM1 suivie rapidement par la destruction de la membrane via le cholestérol. Les peptides agissent comme des détergents qui solubilisent les lipides.

Nous avons aussi montré que le peptide sous forme oligomérique stable, oG37C, est celui qui interagit de manière la plus efficace avec les membranes. De plus, nous avons pu observer que le peptide WT interagit avec les membranes sous forme agrégée correspondant à des oligomères et non sous forme monomérique. La différence observée entre WT et oG37C est d'ordre cinétique ce qui peut s'expliquer par le fait que l'espèce oG37C est déjà sous la forme d'oligomères stables alors que le WT injecté en tant que monomère doit d'abord former des oligomères avant d'interagir avec les membranes. Ces résultats semblent être en accord avec l'hypothèse avancée par Vignaud *et al* [5] de la formation d'espèces *off-pathway*. Il semblerait que l'interaction d' $A\beta_{1-42}$  avec des membranes composées de GM1 et cholestérol favoriserait la formation de ces espèces *off-pathway*.

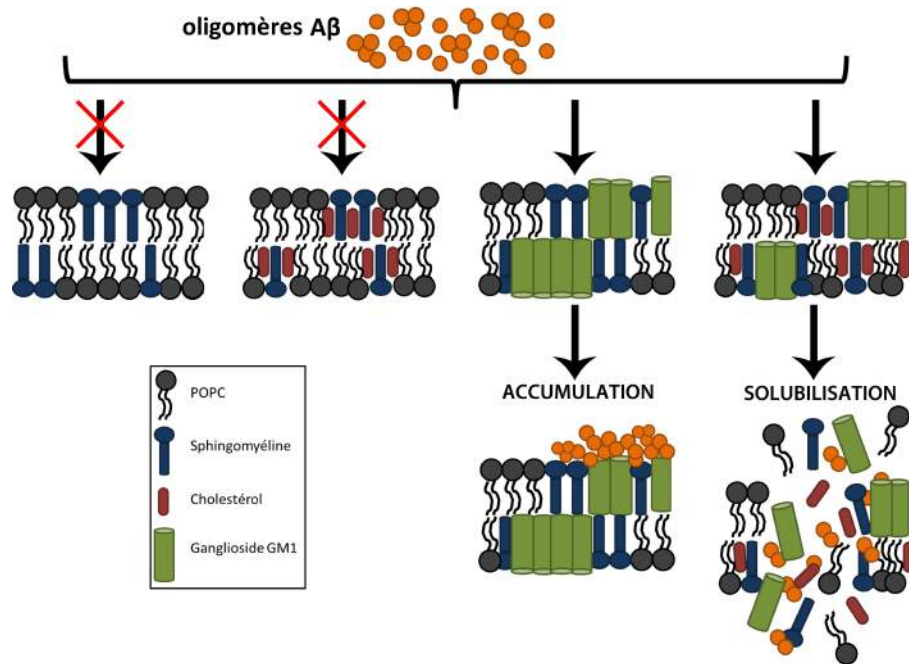


FIGURE 5.13 – Mécanisme proposé pour l'interaction des peptides A $\beta_{1-42}$  et mutants avec des membranes mimant les membranes neuronales. Mise en évidence de l'importance du cholestérol et des gangliosides GM1.

Ces travaux nous permettent de proposer un mécanisme d'interaction des protéines amyloïdes A $\beta_{1-42}$  avec les membranes (fig 5.13). Nous avons montré qu'A $\beta$  interagit avec les "clusters" de GM1 présents dans les membranes contenant du cholestérol sous leur forme oligomérique provoquant la solubilisation de ces dernières. Le GM1 sert de point d'accroche aux peptides et le cholestérol est un élément essentiel pour la perméabilisation de la membrane.

#### MESSAGE A RETENIR

- Accès à la dynamique et la structure des peptide d'A $\beta_{1-42}$  *in situ*
- Solubilisation de la membrane en présence de GM1 et Cholestérol
- Mécanisme d'interaction via l'ancrage des peptides aux GM1
- Oligomères = espèces mises en jeu lors de l'interaction

## Conclusions et perspectives





---

Notre travail avait pour objectif d'étudier l'interaction avec des membranes modèles du peptide A $\beta_{1-42}$ -WT et de mutants présentant, dans la levure, des toxicités variables. Le panel était composé d'un mutant moins toxique que WT, L34T et un mutant plus toxique, G37C. Le mutant G37C a pour caractéristique la formation d'un oligomère stable hypertoxique adoptant une structure secondaire en feuillets- $\beta$  anti-parallèles. Dans cette étude, nous avons caractérisé la dynamique et l'effet des différents peptides sur les membranes lipidiques modèles. Les résultats obtenus nous ont permis de proposer un mécanisme d'interaction du peptides A $\beta_{1-42}$  avec les membranes.

Par le biais de différentes techniques biophysiques, nous avons pu mesurer les propriétés amyloïdes, la morphologie et la dynamique des peptides en interaction avec des membranes modèles. Nous avons utilisés deux types de membranes lipidiques modèles, des monocouches et des bicouches, dont nous avons fait varier la composition et la charge des lipides.

Nous avons dans un premier temps montré que le peptide A $\beta_{1-42}$  présentait une affinité pour les lipides négativement chargés (DOPG), contrairement aux lipides zwitterioniques (DOPC) induisant une forte perturbation de l'intégrité des membranes. L'interaction avec l'oligomère oG37C, présentant une forte toxicité *in vivo*, conduit à la destruction quasi complète des membranes. Cette étude nous a aussi montré que les fibres matures des différents peptides n'interagissent pas avec les membranes modèles, ce qui est en accord avec l'hypothèse établissant un lien entre toxicité et rôle des oligomères.

D'autres études sur l'interaction des peptides A $\beta_{1-42}$ -WT et G37C avec des modèles membranaires plus complexes incluant des GM1 et du cholestérol ont été menées. Les résultats montrent que la présence de ces deux constituants est nécessaire pour qu'A $\beta_{1-42}$  induise la destruction de la membrane. Les peptides (WT et oG3C) interagissent avec la membrane en deux temps : ils sont tout d'abord attirés par les domaines de gangliosides GM1, sur lesquels ils s'accumulent, pour ensuite s'insérer dans la membrane *via* le cholestérol se trouvant au contact des GM1 et ainsi induire la destruction complète de la membrane. Nous avons également pu observer que notre modèle oligomérique stable (oG37C) interagit avec les membranes deux fois plus rapidement qu'A $\beta_{1-42}$ -WT. L'interaction avec les membranes se ferait par le biais d'un changement morphologique de l'état monomérique vers une conformation oligomérique favorisée par la présence des GM1.

Une étude préliminaire de l'interaction de l'oligomère G37C avec des bicouches de GM1 /Chol /PC par spectroscopie ATR-FTIR semble indiquer un effet détergent des peptides, ce qui est en accord avec les observations effectuées par AFM haute-vitesse. L'ensemble des résultats obtenus au cours de ces travaux semblent être en accord avec l'hypothèse de toxicité proposée par Vignaud *et al*, selon laquelle le mécanisme de toxicité d'A $\beta_{1-42}$  s'effectuerait par la formation d'espèces oligomériques *off-pathway*. Ces espèces sont caractérisées par une taille réduite, et une structure secondaire en feuillets- $\beta$  anti-parallèles. Le modèle oligomérique oG37C utilisé a montré une plus grande efficacité d'interaction et un effet plus délétère sur les membranes que les autres peptides.

La poursuite de l'étude de l'interaction des peptides avec les bicouches composées de GM1 et cholestérol par spectroscopie infrarouge permettrait de confirmer les premiers résultats de l'effet

détergent. Il serait également intéressant de faire varier les quantités de cholestérol et GM1 dans la composition lipidique modèle. Certains travaux de la littérature indiquent le caractère inhibiteur ou accélérateur du cholestérol en fonction de sa concentration pour l'interaction d'A $\beta$  sur avec les membranes. La diminution de la teneur en GM1 et cholestérol permettrait aussi de comprendre le rôle des domaines lipidiques dans l'interaction d'A $\beta$  avec des membranes.

# Annexes



## 6.4 Expression et purification des peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub>

Ce protocole a été mis au point par l'équipe du Professeur Cullin [5].

Le système par auto-induction ZYM 5052 a été utilisé pour l'expression d'A $\beta$  dans *Escherichia coli* [302]. Plusieurs clones de BL21De3 pLysS transformés par le plasmide PetSac contenant le gène A $\beta$ <sub>1-42</sub> ou ses variants, ont été cultivés à 37°C dans 10 ml de milieu LB contenant 1% glucose, 100 mg/L d'ampicilline, et 25 mg/L de chloramphénicol [302]. Cette préculture a été ensuite ajoutée à 990 ml de milieu ZYM 5052 (1 % tryptone, 0.5 % extrait de levure, 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mM NH<sub>4</sub>Cl, 5 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5 % glycerol, 0.05 % glucose, 0.2 % lactose) contenant 100 mg/L d'ampicilline et 25 mg/L de chloramphénicol, puis incubé durant une nuit à 37°C.

Au cours de l'expression dans *Escherichia coli*, le peptide A $\beta$  s'agrège et se trouve stocké sous la forme de corps d'inclusion. Afin de pouvoir les purifier, le culot cellulaire a été resuspendu avec 2,5 ml de tampon TE (50mM Tris, 1mM EDTA pH 8), soniqué 5 fois 1 minutes sur glace, puis centrifugé pendant 15 minutes à 30 000g à 4°C. Ce nouveau culot a été resuspendu dans du tampon TE (1ml pour 1g), soniqué durant 3 minutes sur glace et centrifugé pendant 15 minutes à 30 000g à 4°C.

Durant au moins 4 heures à 4°C, 1g de corps d'inclusion contenant les peptides agrégés ont été solubilisés avec 8 ml de tampon TE Urée (50mM Tris pH 8, 1mM EDTA, 8M Urée) puis centrifugés pendant 30 minutes à 30 000g à 4°C. Le surnageant a été ensuite dialysé une nuit à 4°C contre de l'eau (Spectra/Por Dialysis Membrane MWCO 3,500). Après une heure d'ultracentrifugation à 100 000g à 4°C, urée, Tris et EDTA ont été ajoutés au surnageant aux concentrations finales suivantes : urée 8M, Tris 25mM pH8, et EDTA 1mM. La solution a été passée à travers une colonne à centrifuger d'ultrafiltration de porosité 30KDa (Amicon® Ultra centrifugal filters Ultracel-30K). Le filtrat a été dialysé une nuit à 4°C contre de l'eau. Le dialysat a été congelé dans de l'azote liquide, puis lyophilisé 2 jours.

La lyophilisat a été solubilisé dans 500 $\mu$ L de tampon TE Urée (50mM Tris pH 8, 1mM EDTA, 8M Urée) et centrifugé 5 minutes à 12 000g à 4°C. Les monomères et les oligomères d'A $\beta$  ont été séparés par chromatographie d'exclusion stérique sur une colonne Superdex-200 10/300 GL (GE Healthcare). La colonne a été équilibrée à 4°C dans un tampon phosphate salin (PBS : 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,76mMKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4). L'étalonnage de la colonne a été effectué en injectant 50 $\mu$ L de standard de gel filtration (Biorad). Les fractions monomériques et oligomériques d'A $\beta$  ont été récupérées séparément, aliquotées, puis congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C jusqu'à utilisation. Chaque lot a été quantifié par un dosage Bradford et des analyses en spectroscopie de masse ont été régulièrement effectuées.

## 6.5 Matériel et méthode

### 6.5.1 Matériel

Les lipides utilisés pour la formation des monocouches lipidiques, des bicouches supportées ou des liposomes proviennent de Avanti Polar Lipids, Inc :

- 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sel de sodium) (DMPG)
- 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC)
- L- $\alpha$ -phosphatidylcholine (99%) (EggPC)
- 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (sel de sodium) (DOPG)
- 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC)
- Sphingomyéline (SM)
- Ganglioside GM1
- Cholesterol (>98 %) (Chol)

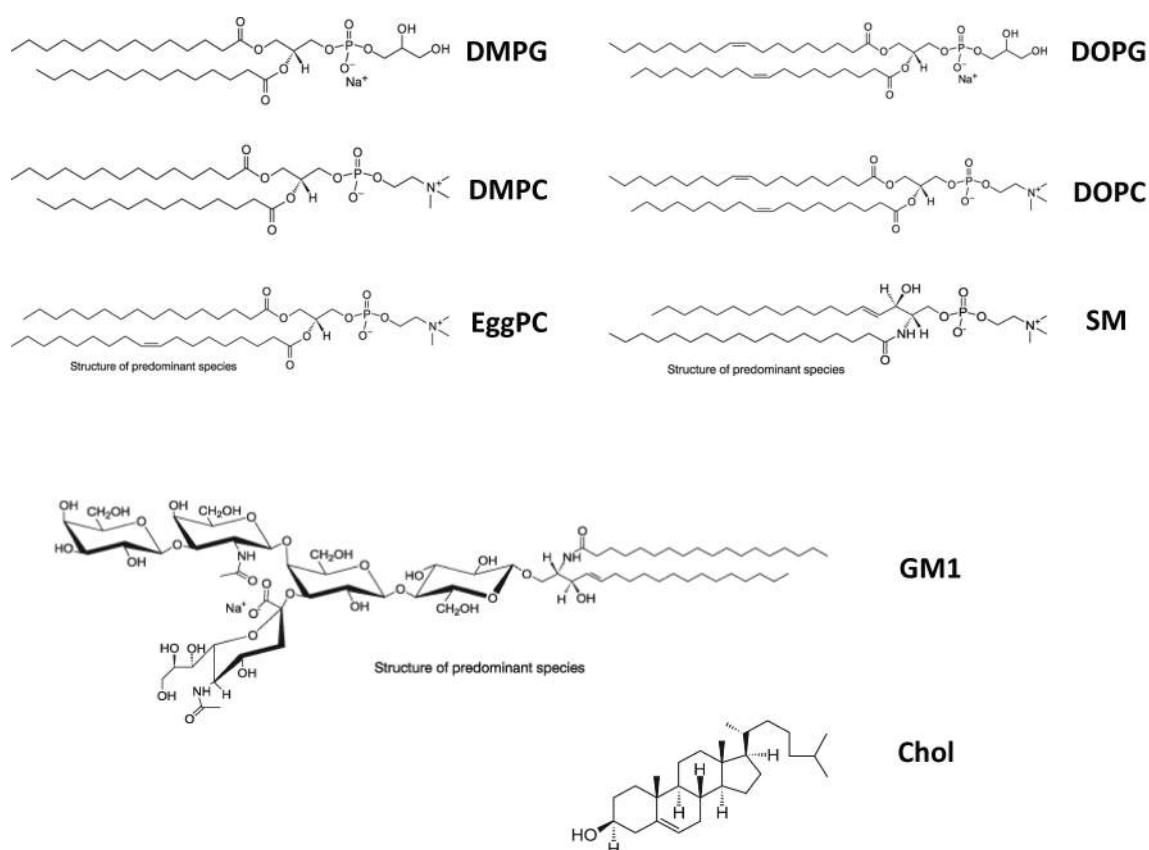


FIGURE 6.1 – Structure des différents lipides utilisés au cours de ces travaux (Avanti Polar, Inc).

Dans ce travail, nous avons aussi utilisé d'autres produits chimiques : Tris(hydroxyméthyl)amino-méthane (99,8%), Chlorure de sodium (NaCl, 99,5%), calcéïne, Thioflavine T, DTT (Dithio-thréitol) (Sigma-Aldrich), D<sub>2</sub>O (Eurisotop), solvants organiques (méthanol, chloroforme, squalène) (99,9%) (Aldrich). De l'eau ultrapure avec une résistance nominale de 18m $\Omega$ .cm (Milli-Q Millipore) a été utilisé pour préparer le tampon A : Tris-HCl 10mM, NaCl 150 mM, DTT 5mM, pH 7,4.

### 6.5.2 Préparation des liposomes

Pour la préparation des liposomes, les lipides ont été dissous dans une solution de chloroforme et méthanol (4 :1 vol/vol). Le film lipidique est obtenu par évaporation de la solution sous flux

d'azote. Le film est ensuite laissé pendant 3-4h sous vide afin d'éliminer toute trace de solvant organique.

*LUV (Large Unilamellar Vesicle)* Le film formé est ensuite hydraté soit par une solution de calcéïne dans du tampon (Tris-HCl 10mM, NaCl 150 mM, DTT 5mM, Calcéïne 70mM à pH 7,4) soit par du tampon Tris (Tris-HCl 10mM, NaCl 150mM et DTT 5mM) pour les expériences de ThT et le tout est vortexé jusqu'à dissolution totale. La suspension de lipide a été soumise à cinq cycles chaud/froid : plongée dans de l'azote liquide puis dans un bain d'eau à 40°C. Les liposomes obtenus sont ensuite extrudés avec l'aide d'un mini-extruder et des membranes poreuses avec des pores de 100 nm de diamètre [152]. La concentration des lipides a été déterminée par un dosage phosphate [303]. Des expériences de diffusion dynamique de la lumière ont permis de mesurer une population homogène de liposomes d'environ 120 nm de diamètre.

*SUV (Small Unilamellar Vesicle)* Le film formé est ensuite hydraté avec du D2O et vortexé jusqu'à dissolution totale. Les vesicules sont fabriquées par sonication des suspensions de lipides à l'aide d'une sonde de sonication en titane environ 5 fois pendant une durée de 10 minutes à une puissance de 40 par pulses de 3 secondes en laissant reposer et bien refroidir entre les différentes sonications. Pour assurer le refroidissement, la solution est plongée dans un bain de glace pour éviter la dégradation thermique des lipides. Les traces de titane sont ensuite éliminées par centrifugation (6000 rpm pendant 2 minutes (Fisherbrand)).

### 6.5.3 Ellipsométrie-PM-IRRAS

Les expériences d'adsorption des peptides à l'interface air-eau ont été effectuées à température ambiante dans une cuve en Teflon circulaire (20, 4 cm<sup>2</sup>). La pression de surface ( $\pi$ ) est mesurée par la méthode de Wilhelmy avec une plaque de papier filtre supportée par un tensiomètre NIMA. La cuve est remplie avec 8 ml de tampon Tris-NaCl à pH 7,4. La tension de surface du tampon est mesurée à  $73,6 \pm 3$  mN.m<sup>-1</sup>. Dans le cas des interactions des peptides avec des monocouches lipidiques, les lipides dilués dans une solution de chloroforme/méthanol (80%/20% v/v) à 0,5 mg.ml<sup>-1</sup> ont tout d'abord été dispersés à l'interface air-eau jusqu'à atteindre la tension de surface de 28mN.m<sup>-1</sup>. Après évaporation des solvants et stabilisation de la tension de surface, nous avons obtenu expérimentalement une pression de  $27,9 \pm 1,3$  mN.m<sup>-1</sup>. Les peptides ont ensuite été injectés délicatement en sous-phase pour une concentration finale de 1μM.

#### 6.5.3.1 Ellipsométrie

L'épaisseur des films formés a été déterminée avec l'ellipsomètre NFT IELI2000 (Göttingen, Allemagne) équipé d'une source monochromatique (laser à 532 nm), un polariseur, d'une lampe compensatrice à 45°, un analyseur et une caméra CCD. L'appareil fonctionne en utilisant la méthode du zéro. L'épaisseur a été obtenue à partir de la mesure des angles ellipsométriques ( $\psi$  et  $\Delta$ ) avec un angle d'incidence de 54,58° qui donne les conditions du zéro. La morphologie des films formés à l'interface air-eau a été observée avec la caméra CCD. La résolution spatiale est d'environ 1 à 2μm et la taille des images de 450×670 μm en utilisant une lentille avec un grossissement ×10. Les angles du polariseur, du compensateur et de l'analyseur qui donnent les



condition du zéro permettent d'obtenir les angles  $\psi$  et  $\Delta$  qui sont liés aux propriétés optiques de l'échantillon. Dans le cadre de films ultraminces,  $\Delta$  est proportionnel à l'épaisseur du film. Les données expérimentales sont traitées par un modèle optique incluse dans le logiciel de l'ellipsomètre est nous permettent de déduire l'épaisseur du film pour un indice de réfraction donné. L'indice de réfraction a été choisi à 1,45.

### 6.5.3.2 PM-IRRAS

Les spectres PM-IRRAS ont été enregistrés sur un spectromètre Nicolet Nexus 870 équipé d'un détecteur photovoltaïque HgCdTe (MCT) refroidi à 77K avec de l'azote liquide. Les spectres sont enregistrés avec une accumulation de 800 scans à une résolution de  $8\text{ cm}^{-1}$ . Les spectres sont le résultat du ratio des spectres protéines+lipides/spectre du tampon. Les détails des expériences de PM-IRRAS sont inspirés d'un protocole décrit précédemment [170]. Les mesures ont été effectuées à température ambiante.

### 6.5.4 Fuite de calcéïne

Les solutions de liposomes contenant la calcéïne sont ensuite séparées de la calcéïne libre à l'aide d'une colonne de chromatographie à exclusion stérique (Sephadex G-75). Les mesures de fluorescence ont été effectuées avec un lecteur de microplaques Polar Star omega (BMG Labtech, Champigny-sur-Marne, France). Après l'ajout des réactifs dans les puits, la microplaque est agitée avant chaque mesure. Les données ont été collectées toutes les 120 secondes à  $25^\circ\text{C}$ , à une longueur d'onde d'excitation  $\lambda_{excitation}$  de 485 nm pour une longueur d'onde d'émission de  $\lambda_{emission}$  de 520 nm. Les liposomes ont été introduits dans les puits à une concentration fixée à  $10\text{ }\mu\text{M}$  pour une concentration variable de peptides de 0,01 à  $5\text{ }\mu\text{M}$  dans un volume final de  $200\text{ }\mu\text{L}$ . Après 4h d'incubation,  $1\text{ }\mu\text{L}$  d'une solution de Triton X-100 à 10% (Sigma) est ajouté à chaque puits pour obtenir la valeur de fluorescence correspondant à 100% de fuite de calcéïne des liposomes. Le pourcentage de calcéïne libérée a été calculé selon l'équation suivante :  $L(t) = [(F_t - F_0)/(F_{max} - F_0)] \times 100$ , où  $L(t)$  est le pourcentage de calcéïne libérée (%),  $F_t$  est l'intensité de fluorescence mesurée au temps  $t$ ,  $F_0$  est l'intensité de fluorescence au temps  $t = 0$  et  $F_{max}$  est l'intensité de fluorescence après l'ajout de Triton X-100.

### 6.5.5 Fluorescence de la ThT

Les peptides, dont la concentration était fixée à  $20\text{ }\mu\text{M}$ , ont été incubés avec différentes concentrations de liposomes, entre 0,04 et  $2\text{ mM}$ , en présence de  $20\text{ }\mu\text{M}$  de Thioflavine T pour un volume final de  $200\text{ }\mu\text{L}$  pendant 24h. Les mesures de fluorescence ont été effectuées avec un lecteur de microplaques Polar Star Omega (BMG Labtech, Champigny-sur-Marne, France). Après l'ajout des réactifs, la microplaque est agitée pendant 10 s avant chaque mesure. Les données collectées correspondent à la moyenne de 10 mesures toutes les 6 minutes à  $30^\circ\text{C}$ , à une longueur d'onde d'excitation  $\lambda_{excitation}$  de 440 nm pour une longueur d'onde d'émission de  $\lambda_{emission}$  de 480 nm. Les résultats correspondent à la moyenne de trois mesures indépendantes.

### 6.5.6 Expériences de PWR

Les spectres de résonance de plasmons aux ondes guidées sont le produit de excitation de l'oscillation des électrons de conduction (plasmons) par le rayon d'un laser polarisé CW incident (He-Ne ; longueur d'onde de 632 nm) qui se réfléchit à la surface d'un fin film d'argent déposé sur un prisme de verre et recouvert d'une couche de silice  $SiO_2$  [177]. Les expériences ont été réalisées sur un montage PWR fait maison décrit précédemment [183]. Les résonances ont été obtenues avec un rayon incident combinant simultanément les polarisations parallèles (polarisation  $-s$ ) et perpendiculaires (polarisation  $-p$ ) ce qui permet d'obtenir les deux contributions sur les spectres PWR, où l'intensité de lumière réfléchie normalisée est représentée en fonction de l'angle incident. Les bicouches lipidiques supportées sont formées en injectant environ 2  $\mu$ L d'une solution de lipides (10 mg/mL dans un mélange de butanol et squalène, 0,95/0,005 v/v) au sein de l'orifice d'un bloc de teflon qui est en contact direct avec la couche de silice du prisme. La bicouche est spontanément formée après le remplissage du réservoir en Teflon avec du tampon Tris et rincée plusieurs fois dans le but de retirer l'excès de lipides. Les molécules (lipides ou peptides) déposées sur ou au proche contact de la surface du résonateur changent les résonance de plasmons ce qui peut par la suite être détecté et caractérisé. Le plasmon est une sonde sensible aux propriétés optiques du matériaux déposé sur ou proche du résonateur ; il ne peut y avoir d'interférences dues au matériel en solution. Les spectres sont acquis et comparés aux spectres obtenus avec le tampon seul afin de s'assurer de la formation de la bicouche. Le décalage angulaire obtenu en polarisation  $-p$  doit être supérieur à celui obtenu en polarisation  $-s$ .

Les peptides ont été injectés en solution à une concentration fixée à 5  $\mu$ M et l'évolution spectrale a été suivie dans le temps pendant 24h. La quantité de peptide liée à la bicouche est associée au décalage des résonances observé. Au bout de 24h, la cellule PWR est rincée pour éliminer tout le matériel non lié à la bicouche. Des ajustements de courbes basés sur les équation de Fresnel et le formalisme de matrices, ont été effectués avec le logiciel Winspall (Worm J. Winspall version 3.02, 2009) pour établir les épaisseurs de la couche formées sur le prisme.

### 6.5.7 Expériences de cryo-TEM

Les peptides (à 10  $\mu$ M) ont été incubés avec 20  $\mu$ M de liposomes de DOPG dans le tampon A. Les échantillons ont été observés à différents temps d'incubation : 2h et 24h, correspondant à différents états d'agrégation. Un aliquot de 5  $\mu$ L est déposé sur une grille de cuivre de carbone dentelé (Ted Pella). Après avoir retiré l'excès de solution avec du papier filtre, la grille est rapidement plongée dans un bain d'éthane liquide refroidit avec de l'azote liquide utilisant EM CPC (Leica). Les échantillons ont été maintenus à une température d'environ -170°C, grâce à un étui cryo (Gatan, U.S.A), et observés en condition de faible dose avec une microscope électronique FEI Tecnai F20 opérant à 200kV.

## 6.6 Instrumentation

### 6.6.1 L'ellipsométrie

Basée sur la théorie classique de Paul Drude (1889), l'ellipsométrie est une méthode optique très sensible et polyvalente pour l'analyse et la caractérisation de surface ou de films déposés à la surface, qui mesure le changement d'état de polarisation d'un faisceau lumineux par réflexion sur la surface plane d'un échantillon. Au départ utilisé principalement pour l'étude des surfaces métalliques et du processus d'oxydation et de corrosion [304], ses applications se sont largement diversifiées dans les années 60 [305] notamment autour du processus d'adsorption (de vapeur, de macromolécules...).

L'ellipsométrie est basée sur la mesure du changement de l'état de polarisation de la lumière suite à sa réflexion sur une surface plane, le faisceau de lumière polarisée est réfléchi et sa polarisation est modifiée. La modification de la polarisation dépend des propriétés structurales et optiques de l'échantillon. Lorsqu'une onde plane linéaire est réfléchi sur une surface plane avec un angle azimutal par rapport au plan d'incidence, l'onde réfléchi est elliptique (fig 6.2). L'analyse des données obtenues lors de la mesure permet d'obtenir les propriétés optiques et les paramètres d'épaisseur de l'échantillon constituant la surface.

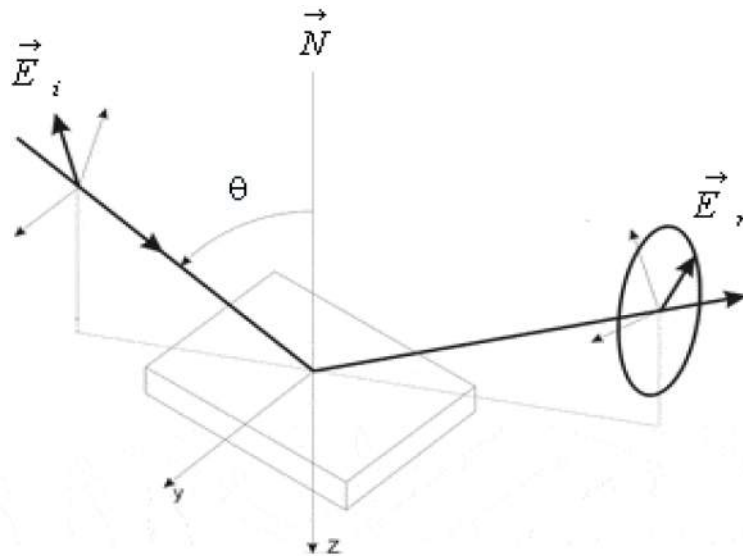


FIGURE 6.2 – Schéma de principe de l'ellipsométrie

La lumière est un champ électromagnétique caractérisé par deux vecteurs : un vecteur champ électrique  $\vec{E}$  et un vecteur champ magnétique  $\vec{H}$ , perpendiculaires l'un à l'autre vibrant à la même fréquence et perpendiculairement au sens de propagation. L'état de polarisation est principalement défini par le champ électrique  $\vec{E}$ .

La modification du champ électrique après réflexion sur la surface est représentée par deux coefficients qui agissent sur les deux composantes du champ perpendiculaire (s) et parallèle (p) au plan d'incidence : respectivement  $r_s$  et  $r_p$  et le déphasage ( $\delta_p$  et  $\delta_s$ ) induit sur les ondes polarisées par la réflexion. Les modules  $|r_p|$  et  $|r_s|$  représentent la variation d'amplitude des champs électriques pour les deux polarisations.

Le changement d'état de la polarisation est défini par le rapport  $R$  (eq 6.1)

$$R = \frac{r_p}{r_s} = \tan \Psi e^{i\Delta} \quad (6.1)$$

$\Psi$  et  $\Delta$  sont les angles ellipsométriques. Ils sont définis par  $\tan \Psi = |\frac{r_p}{r_s}|$  et  $\Delta = \delta_p - \delta_s$ . L'angle  $\Psi$  peut adopter des valeurs comprises entre 0 et  $\frac{\pi}{2}$  et caractérise le module du rapport des coefficients de réflexion. L'angle  $\Delta$  (compris entre 0 et  $2\pi$ ) représente la différence de phase. La mesure de  $R$  permet l'identification des angles  $\Psi$  et  $\Delta$  et permettent de déduire deux paramètres de l'échantillon connaissant son indice de réfraction : l'épaisseur de la couche ( $e$ ) et son coefficient d'extinction ( $k$ ).

Dans le cadre de l'étude de films très minces,  $\Psi$  varie peu avec l'épaisseur, mais l'angle  $\Delta$  est directement corrélé à l'épaisseur du système. La différence de l'angle  $\Delta$  mesuré pour la couche par rapport à la valeur du substrat nu  $\Delta_0$  ( $\delta\Delta = \Delta_0 - \Delta$ ) varie de manière linéaire avec l'épaisseur de la couche pour un indice de réfraction  $n$  donné.

L'appareil dont nous disposons (IElli2000) est un ellipsomètre à annulation (fig 6.3), il effectue les mesures de  $\Delta$  et  $\Psi$  par la méthode du zéro c'est-à-dire par annulation du signal réfléchi. Cette technique est basée sur la caractérisation de la lumière réfléchie par la recherche d'un minimum de flux réfléchi. Le montage est constitué d'une source monochromatique (laser à 532 nm), un polariseur linéaire à l'angle  $P$ , un compensateur qui va transformer la polarisation qui est linéaire après le polariseur en polarisation elliptique et un analyseur. On obtient les conditions du zéro lorsque le compensateur est orienté (à  $45^\circ$ ) de sorte à transformer la vibration elliptique réfléchie par la surface en une vibration rectiligne éteinte par la suite par l'analyseur. Les angles azimutaux  $P$  et  $A$  correspondant aux angles pris par le polariseur et l'analyseur permettent d'obtenir l'annulation du flux sur un domaine donné et de calculer les angles  $\Delta$  et  $\Psi$  du domaine considéré :  $\Delta = 450^\circ - 2P$  et  $\Psi = -A$ .

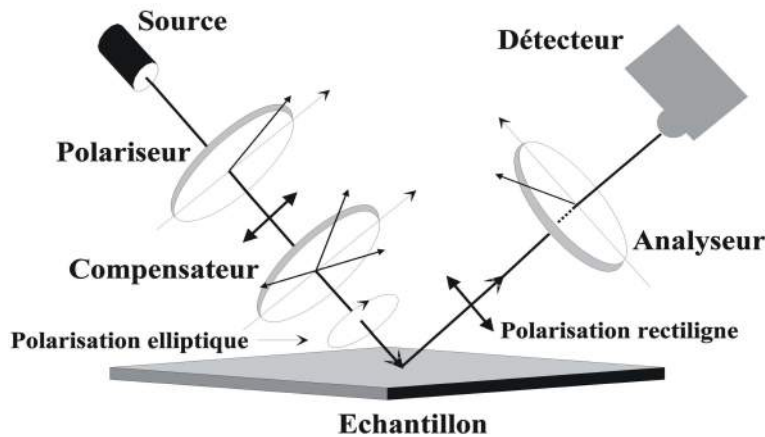


FIGURE 6.3 – Schéma d'un ellipsomètre à annulation

### 6.6.2 La spectroscopie PM-IRRAS

La spectroscopie PM-IRRAS a été développée pour la première fois en France dans les années 90 au Laboratoire de Physico-Chimie Moléculaire de l'université de Bordeaux [306]. Cette

technique permet la caractérisation de films ultraminces (1-20 nm) à l'interface air-eau in situ par spectroscopie infrarouge avec un gain en détectivité de plusieurs ordres de grandeur par rapport à la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF). De plus la spectroscopie PM-IRRAS peut-être utilisée pour de nombreuses autres applications telles que l'analyse de surface et de revêtement de surface, l'étude de la géométrie d'espèces adsorbées et la nature des interactions mises en jeu, la caractérisation de couches minces organiques et inorganiques.

La technologie IRRAS est basée sur l'observation que lorsqu'une radiation, appartenant au moyen infrarouge, entre au contact de monocouche de films aqueux, seule une petite fraction de la lumière (environ 6%) est réfléchiée par les constituants moléculaire de la surface. Les spectres IRRAS représentent la Reflectance-Absorbance (RA) en fonction des nombres d'ondes. RA est défini comme  $-\log_{10}(R/R_o)$  où R est la réflectivité de la surface recouverte par le film et  $R_o$  la réflectivité de la sous-phase aqueuse [307]. On peut remarquer que le signal IRRAS correspond à la normalisation du spectre de l'échantillon par le spectre du substrat seul. Cette normalisation est nécessaire car l'IRRAS ne permet pas de discriminer les absorptions surfaciques des absorptions volumiques. Cette normalisation du signal permet ainsi d'obtenir les absorptions inhérentes uniquement au film.

Pratiquement, on obtient le signal en enregistrant l'un après l'autre les spectres du substrat seul et de l'échantillon, ce qui entraîne des fluctuations du montage optiques et de l'environnement et des conséquences sur la qualité du spectre IRRAS. Cette perte de qualité ne permet pas la détection de films ultra-mince, d'épaisseur inférieure à 100.

C'est dans l'optique de contrer cet inconvénient que le PM-IRRAS (Polarisation Modulation-InfraRed Reflexion Absorption) a été développé. L'avantage du PM-IRRAS provient de l'utilisation d'une réflectivité modulée qui est indépendante de l'adsorption isotrope due à la vapeur d'eau ou de la sous-phase aqueuse et améliore ainsi la détectivité du signal(fig 6.4).

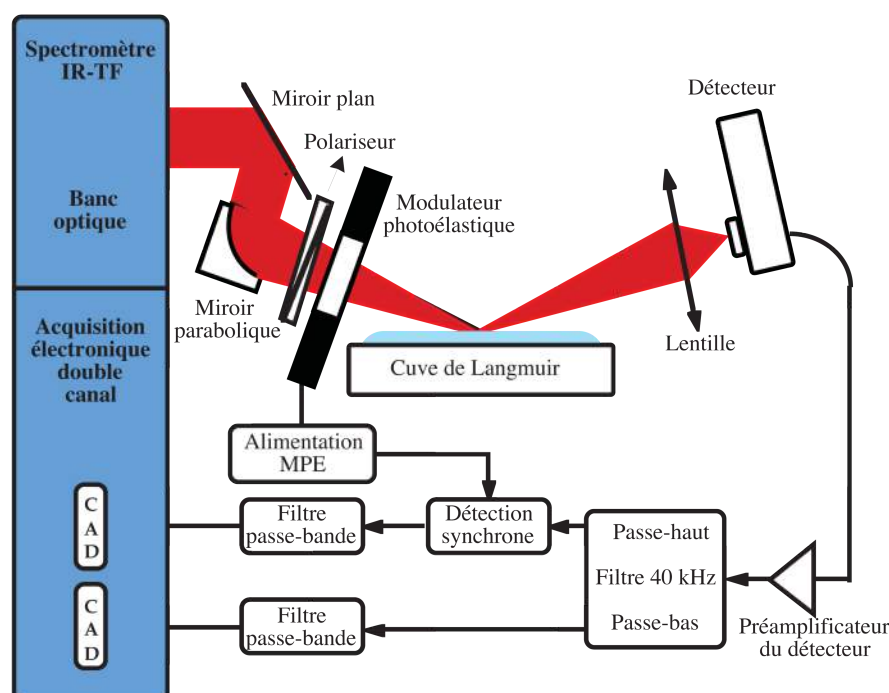


FIGURE 6.4 – Schéma du montage PM-IRRAS

La technique de PM-IRRAS est la combinaison de trois techniques que sont la spectroscopie IRRAS, la modulation rapide de la polarisation du champ électrique incident entre les polarisation  $p$  et  $s$  (obtenue en appliquant une tension sinusoïdale de fréquence  $f_m$  au modulateur photoélastique) et un traitement électronique permettant d'obtenir un signal de réflectivité différentielle normalisé (éq 6.2) :

$$\frac{\Delta R}{R} = \frac{R_p - R_s}{R_p + R_s} \quad (6.2)$$

Avec  $R_p$  et  $R_s$  les réflectivités résultantes respectivement des état de polarisation parallèle (p) et perpendiculaire (s).

Après sa réflexion en incidente quasi rasante sur l'échantillon le signal détecté (intensité) s'écrit (éq 6.3) :

$$I_d^S = \frac{1}{2} I_0^S ((R_p + R_s) - (R_p - R_s) \cos \Phi(t)) \quad (6.3)$$

Où  $I_0^S$  représente l'intensité lumineuse du champ électrique après le polariseur orienté  $s$  à la sortie du spectromètre et  $\Phi(t)$  correspond au déphasage introduit par le modulateur photoélastique entre les deux composantes du champ électrique.

La détection électronique du signal est limitée à une bande passante comprise entre 0 et  $2f_m$  et en écrivant le  $\cos \Phi(t)$  sur la base des fonctions de Bessel ( $J_0$  et  $J_2$ ), on peut écrire l'intensité du signal détecté comme la somme de deux signaux (éq 6.4) :

$$I_d^S = \frac{1}{2} I_0^S (((R_p + R_s) - (R_p - R_s) J_0(\Phi_0)) - 2(R_p - R_s) J_2(\Phi_0) \cos(2\omega_m t)) \quad (6.4)$$

Le signal PM-IRRAS est obtenu par le rapport des transformées de Fourier de ces signaux (eq 6.5) :

$$S(d) = \frac{|(R_p(d) - R_s(d)) \cdot J_2(\Phi_0)|}{(R_p(d) + R_s(d)) \pm (R_p(d) - R_s(d)) \cdot J_0(\Phi_0)} \quad (6.5)$$

Où  $R_p$  et  $R_s$  sont les réflectivité polarisées,  $J_0$  et  $J_2$  les fonctions de Bessel à l'ordre 0 et 2,  $d$  l'épaisseur de la couche.

L'optimisation du signal PM-IRRAS est obtenu pour un angle d'incidence rasante proche de  $75^\circ$  qui donne le meilleur rapport signal/bruit. Les spectres PM-IRRAS permettent d'obtenir des informations sur l'orientation des groupements moléculaires constituant l'échantillon grâce à une série de règles de sélection (fig 6.5) :

- une bande d'absorption positive est obtenue si le moment de transition d'un groupement moléculaire est perpendiculaire à la normale à la surface
- une bande d'absorption est négative lorsque le moment de transition d'un groupement moléculaire est parallèle à la normale à la surface
- il y a extinction de la bande d'absorption lorsque le moment de transition est orienté selon l'angle magique ( $\theta=39^\circ$ )

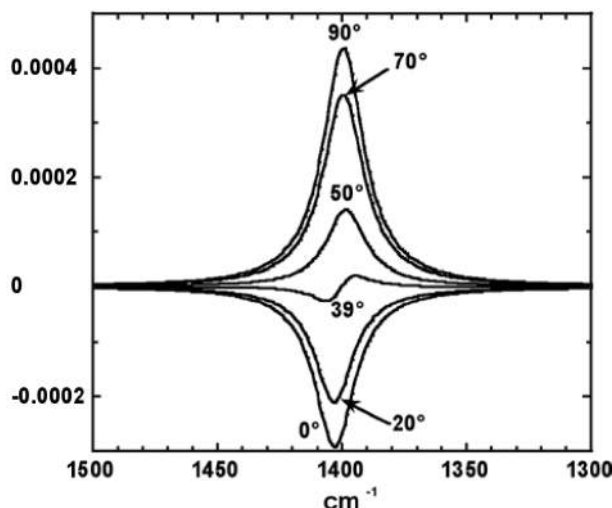


FIGURE 6.5 – Calculs des spectres PM-IRRAS normalisés d'une bande d'absorption ( $1400 \text{ cm}^{-1}$ ) d'une couche mince sur l'eau dont le moment de transition fait un angle variable avec la normal à la surface

### 6.6.3 La spectroscopie PWR (*Plasmon Waveguide Resonance*)

La spectroscopie PWR est une extension de la spectroscopie SPR développée à la fin des années 90 par Salamon et Tollin basée sur le couplage des plasmons de surfaces et des modes d'excitation de guide d'onde permettant de mesurer (entre autre) l'anisotropie optique de systèmes telles que les membranes lipidiques organisées [176].

Le plasmon de surface correspond à l'oscillation d'un quantum de densité d'électrons libres à l'interface entre un métal (Al, Ag, Au, Cu, ...) et un film diélectrique (une bicouche lipidique dans le cadre de nos expériences). L'onde évanescente agit comme une sonde sensible aux changements qui ont lieu à l'interface.

L'oscillation résulte en une onde électromagnétique évanescente qui se propage à l'interface des deux milieux sur une épaisseur d'environ 100 nm et latéralement sur une dizaine de microns. La fréquence de l'onde produite dépend de l'indice optique local du milieu diélectrique. L'onde évanescente est produite dans les conditions de réflexion totale interne (TIR), c'est-à-dire que l'angle du rayon lumineux incident est supérieur à l'angle critique ( $\Theta_C$ ).

On appelle l'angle de résonance plasmonique, l'angle incident pour lequel, à une longueur d'onde donnée, l'énergie apportée par le rayon incident va créer une onde évanescente capable de résonner avec l'onde électromagnétique du plasmon de surface. Le couplage des deux ondes s'effectue par le biais d'un prisme.

En effet, pour qu'un photon puisse exciter un plasmon de surface, ils doivent être en accord de phase. Les photon et les plasmons de surface ne partagent pas les mêmes relations de dispersion. La relation de dispersion du plasmon de surface s'écrit (éq 6.6) :

$$k_x = k_0 \sqrt{\frac{\epsilon_{r,1}(\omega)\epsilon_{r,2}}{\epsilon_{r,1}(\omega) + \epsilon_{r,2}}} \quad (6.6)$$

Avec  $k_x$  le vecteur d'onde du plasmon de surface,  $k_0$  le vecteur d'onde d'une onde plane dans le vide (ici les photons),  $\epsilon(1$  et  $2)$  la permittivité des deux milieux et  $\omega$  la fréquence de l'onde.

La relation montre que  $k_0 < k_x$ , l'onde propagative dans l'air ne peut être couplée à une onde plasmon. L'accord de phase est en revanche possible lorsque la couche métallique est déposée sur un prisme en verre on obtient alors (éq 6.7) :

$$k_x = k_0 \sqrt{\epsilon} \sin(\Theta) \quad (6.7)$$

Avec  $\Theta$  l'angle du faisceau incident. L'onde propagative dans le verre peut exciter un plasmon à l'interface métal-air (fig 6.6).

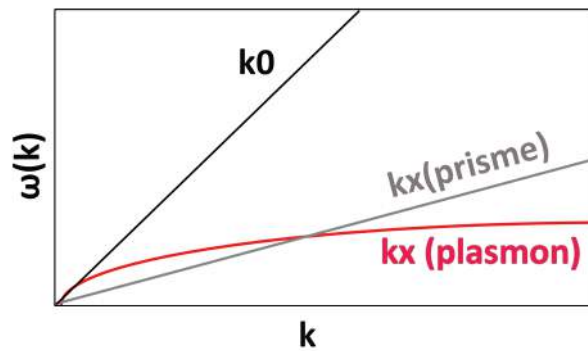


FIGURE 6.6 – Représentation des relation de dispersion d'une onde dans l'air ( $k_0$ ), une onde plasmon ( $k_x$  plasmon) et une onde dans un prisme ( $k_x$  prisme)

C'est la variation de l'angle de résonance plasmonique en fonction de la surface sondée qui est mesuré dans les expériences de résonance de plasmons. On suit en général l'évolution de l'intensité lumineuse réfléchiée en fonction de l'angle d'incidence. En effet, l'énergie nécessaire pour exciter les plasmons va dépendre des espèces présentes à l'interface. La résonance est obtenue en faisant varier l'angle d'incidence grâce à une table tournante supportant le prisme (fig 6.7).

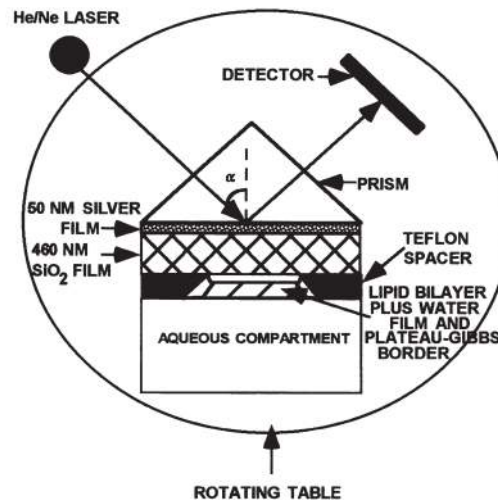


FIGURE 6.7 – Schéma du montage PWR d'après Salamon *et al* [176]



La principale différence entre la PWR et la SPR réside dans l'ajout d'une couche diélectrique ( $\text{SiO}_2$ ) qui recouvre la couche métallique. C'est la couche métallique (en général Ag ou Au), d'une épaisseur comprise en 45 et 55 nm, déposée sur la surface du prisme qui génère l'onde plasmon. Les mesures effectuées sont basées sur l'excitation de la résonance du film déposé à la surface du cristal pour les deux polarisations de l'onde incidente : TM (transversale magnétique, parallèle au plan d'incidence p) et TE (transversale électrique, perpendiculaire au plan d'incidence s). La couche de  $\text{SiO}_2$  joue le rôle de protection mécanique et chimique de la couche métallique et d'amplificateur optique ce qui augmente la sensibilité et la résolution.

Les expériences de PWR permettent de mesurer différents paramètres : angles de résonance, largeur et profondeur des spectres qui sont directement liés à l'indice de réfraction, au coefficient d'extinction pour une longueur d'onde utilisée et à l'épaisseur des couches déposées à l'interface.

Pour l'étude des interactions protéine-lipide la PWR présente un avantage majeur du à l'utilisation des deux polarisations (s et p) ce qui permet d'étudier l'anisotropie optique des films déposés à la surface du prisme sans aucun marquage (fluorophores...). Ce système est particulièrement adapté à l'étude des bicouches lipidiques et leur interaction avec des protéines et permet de suivre en temps réel les changements de structure et de masse du film [177].

### 6.6.4 La fluorescence

La fluorescence est le processus radiatif par lequel une molécule passe d'un état excité singulet ( $S_1$ ) par absorption d'un photon d'énergie  $h\nu$  à son état fondamental ( $S_0$ ) en émettant un photon. En fluorescence, l'émission d'un photon est un phénomène rapide, typiquement de l'ordre de  $10^8 \text{ s}^{-1}$  de sorte que le temps de vie de la fluorescence est proche de 10 ns.

Les molécules capables d'engendrer ce type de processus sont des fluorophores. Le temps de vie d'un fluorophore est le temps moyen entre son excitation et le retour vers son état fondamental. La plupart des fluorophores sont des molécules aromatiques. En effet, la fluorescence est presque toujours associée au système  $\pi$  d'une molécule insaturée car les électrons  $\pi$  sont plus libres que les électrons  $\sigma$ .

La fluorescence est généralement représentée par le diagramme de Jablonski (fig 6.8)

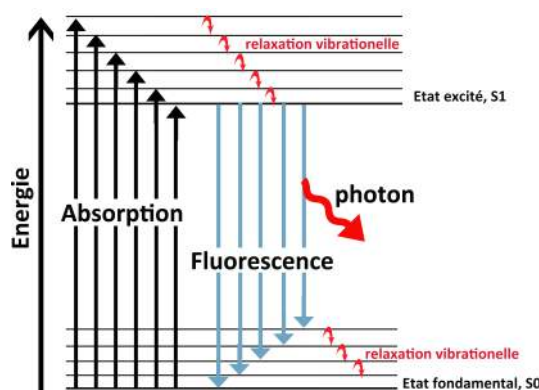


FIGURE 6.8 – Principe de la fluorescence

### 6.6.5 Microscopie champ proche

Le microscope à force atomique (AFM, Atomic Force Microscope) (fig 6.9), a été inventé en 1986 par Binnig, Quate et Gerber, et fait parti des microscopes dits "à sonde locale". Son principe repose sur la mesure des forces d'interaction entre une pointe fine comportant un seul atome en son extrémité et la surface d'un échantillon. La microscopie AFM permet de cartographier à l'échelle nanométrique tout type d'échantillon (conducteur, isolant, biologique...). Ses performances lui confèrent des capacités résolutives de l'ordre du nanomètre, latéralement et de l'ångström, verticalement.

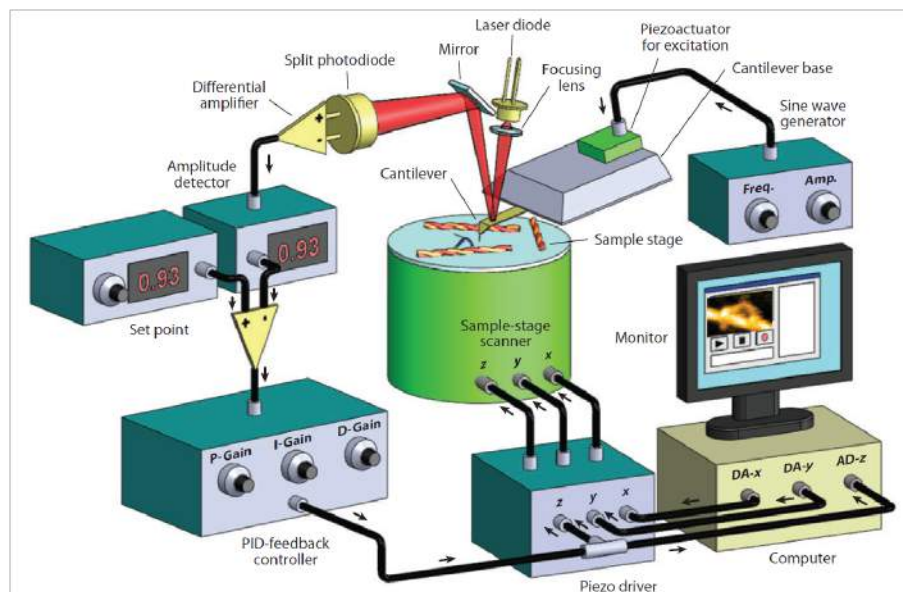


FIGURE 6.9 – Schéma du montage d'un microscope à force atomique (AFM) [246]

La pointe est située à l'extrémité d'un microlevier. La surface de l'échantillon est ainsi cartographiée par le balayage de la pointe en  $(x, y, z)$ , provoquant des mouvements de flexion et déflexion de cette dernière. Ces mouvements sont détectés *via* la réflexion d'un faisceau laser dirigé sur l'extrémité de la pointe, dans un photodétecteur quatre cadrans.

L'énergie lumineuse collectée par le photodétecteur est convertie en courant puis en tension. Une boucle de rétrocontrôle permet de maintenir constante la force d'interaction (à une valeur de consigne) entre la pointe et l'échantillon pendant le balayage.

La microscopie à force atomique peut être utilisée selon deux modes principaux de fonctionnement :

- Le mode contact qui consiste à utiliser les forces répulsives pour retranscrire la surface d'intérêt : la pointe est toujours au contact de l'échantillon. La rétroaction est réalisée par la mesure de la direction de la déviation.
- Le mode contact oscillant qui consiste à faire osciller le levier à sa fréquence propre de résonance avec une certaine amplitude fixée par l'opérateur (point de consigne) : la pointe est au contact de l'échantillon de manière intermittente, minimisant ainsi tout dommages sur l'échantillon. Lorsque la pointe interagit avec la surface, l'amplitude se trouve modifiée. L'asservissement est alors réalisé sur ce paramètre *via* la boucle de rétrocontrôle.

### 6.6.5.1 Le nano-IR

Le nanoIR est une technique innovante développée dans les années 2000 combinant la microscopie de force atomique à une radiation infrarouge : la spectroscopie infrarouge à l'échelle nanométrique [308] [187] [188] [309].

Le principe fondamentale sur lequel est basé la nanospectroscopie infrarouge est que l'amplitude de l'oscillation du cantilever du montage AFM est directement proportionnel au coefficient d'absorption de l'échantillon pour n'importe quelle longueur d'onde infrarouge. Cette corrélation permet d'obtenir un spectre d'absorption infrarouge équivalent aux spectres obtenus avec la spectroscopie infrarouge conventionnelle [309].

Le modèle de la nanospectroscopie infrarouge et la détection du signal inclus cinq étapes principales :

- Absorption du faisceaux IR par l'échantillon
- Génération de la chaleur dans l'échantillon et augmentation de la température résultante
- Impulsions d'expansion thermique de l'échantillon
- Excitation de la résonance du cantilever à partir des impulsions d'expansion thermique
- Extraction des amplitudes du cantilever à des modes de résonance spécifiques

Lorsqu'une radiation du domaine infrarouge irradie un échantillon, le champ électrique de l'onde électromagnétique peut être absorbée par une molécule si la fréquence de la radiation et la fréquence vibrationnelle de la molécules correspondent et si l'interaction induit un changement du moment dipolaire de la molécule. Le coefficient d'absorbance  $A$  s'écrit (éq 6.8) :

$$A = \log \frac{1}{T} = \frac{4\pi z}{\ln(10)} \sigma \kappa(\sigma) \quad (6.8)$$

Avec  $T$  le coefficient de transmittance,  $\kappa$  le coefficient d'extinction molaire et  $\sigma$  le nombre d'onde,  $z$  l'épaisseur du milieu.

L'absorption du faisceaux lumineux par l'échantillon induit une augmentation de sa température. L'évolution de la température peut être décrite par la loi de Fourier (éq 6.9) :

$$\rho C \frac{\delta T}{\delta t} - k \Delta T = \frac{Q(t)}{V} \quad (6.9)$$

Où  $\rho$  est la densité,  $C$  la capacité calorifique,  $k$  la conductivité thermique,  $V$  le volume,  $Q(t)$  la chaleur absorbée et  $\Delta$  l'opérateur de Laplace.

En faisant plusieurs approximations :

- intensité du laser uniforme sur toute la région d'absorption de l'échantillon sondée par la pointe AFM
- épaisseur de l'échantillon ( $z$ ) plus petite que la longueur d'onde
- durée de l'impulsion du laser ( $tp$ ) plus courte que le temps de relaxation de l'échantillon
- pas de gradient de température dans l'échantillon, la chaleur est absorbée de manière homogène

On obtient que l'augmentation de la température pendant l'illumination, dérivée de l'équation 6.9 peut être écrite comme il suit (éq 6.10) :

$$T(t) = \frac{P_{abs}}{V\rho C}t = \frac{4\pi I_{inc}}{\rho C}\sigma\kappa(\sigma)t \quad (6.10)$$

On définit aussi  $T_{max}$  l'augmentation maximale de la température (éq 6.11) :

$$T_{max} = \frac{P_{abs}t_p}{V\rho C} \quad (6.11)$$

A la fin de l'impulsion du laser, la source de chaleur disparaît et l'échantillon refroidit. Le refroidissement de l'échantillon dépend de sa géométrie. L'étude de différentes géométries montre que la diminution de la température à la fin de l'impulsion peut être écrite pour tous les cas (éq 6.12) :

$$T(t) = T_{max}\exp\left(\frac{t_p - t}{\tau_{relax}}\right) \quad (6.12)$$

Où  $\tau_{relax} = \frac{\rho C}{k_{eff}}a^P$  est le temps de relaxation de l'échantillon,  $a$  la taille de l'échantillon (rayon ou longueur caractéristique),  $k_{eff}$  la conductivité effective du système. Cette relation est valable pour un temps de relaxation de l'échantillon supérieur au temps d'impulsion du laser (fig 6.10).

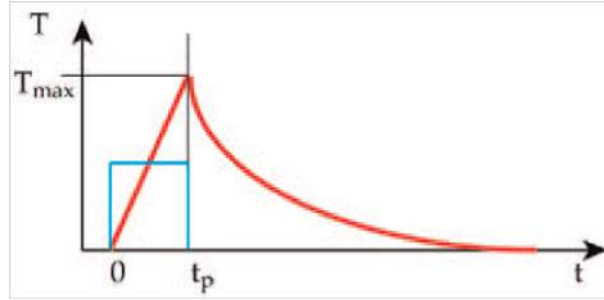


FIGURE 6.10 – Evolution de la température d'un échantillon (rouge) sous l'action d'un laser pulsé (bleu)

L'augmentation de la température au sein d'un matériau, provoque une augmentation du taux de contrainte interne résultant une expansion thermique de l'échantillon. La loi d'expansion d'un échantillon s'écrit (éq 6.13) :

$$\frac{\bar{u}(t)}{a} = B\alpha_T T(t) \quad (6.13)$$

Avec  $\bar{u}$  le vecteur de déplacement,  $B$  une constante associée à la géométrie de l'échantillon (sphère, cube, hémisphère),  $T$  la température,  $\alpha_T$  le coefficient d'expansion thermique et  $a$  la taille de l'échantillon.

La technique de nanospectroscopie infrarouge mesure l'expansion thermique d'un échantillon, résultat d'une absorption infrarouge, en utilisant une pointe AFM. L'expansion thermique rapide de l'échantillon crée une force d'impulsion sur la pointe qui entraîne l'oscillation du cantilever au contact de ses fréquences de résonance (fig 6.11).

La description du montage du nano-IR est représenté à la figure 6.12. Le faisceau laser infrarouge accordable entre dans le prisme ZnSe transparent aux infrarouges avec une incidence nor-

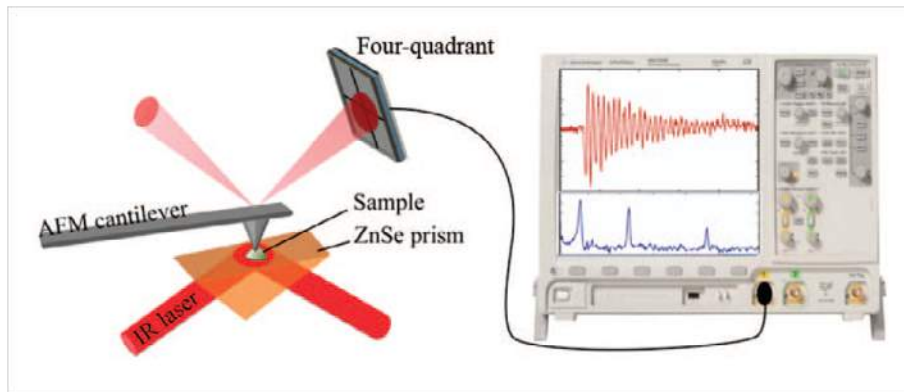


FIGURE 6.11 – Schéma du montage du nano-infrarouge d'après Dazzi [309].

male. Le faisceau laser subit une réflexion interne totale à l'interface entre le prisme et l'échantillon possédant un indice de réfraction autour de 1.5 (valable pour la plupart des matériaux organiques). Une onde stationnaire ou un champ évanescent est produit et se propage à travers l'échantillon sur une distance de l'ordre de grandeur de la longueur d'onde du faisceau lumineux.

La pointe AFM est en contact avec l'échantillon étudié. Sous chaque impulsion du laser, l'expansion thermique de l'échantillon induit une brève force d'impulsion sur la pointe provoquant une vibration aux fréquences de résonance du cantilever AFM. L'oscillation du cantilever est enregistré par la réflexion d'un faisceau laser visible à la surface supérieure du cantilever et en mesurant sa position avec le détecteur (cadran de photodiodes) de l'AFM. Le signal peut être simultanément analysé par le biais *Fast Fourier Transform*, *FTT* qui permet de déterminer les amplitudes et les fréquences des modes de vibration du cantilever. Le signal brute du cantilever contient de nombreux composants de la fréquence de résonance. La mesure des amplitudes de l'oscillation du cantilever en fonction de la source de longueur d'onde crée des spectres d'absorption.

Le signal obtenu par le détecteur ne correspond pas à la déformation totale du cantilever mais uniquement à la déflexion de son extrémité. On obtient une réponse temporelle du signal du cantilever excité (fig 6.12).

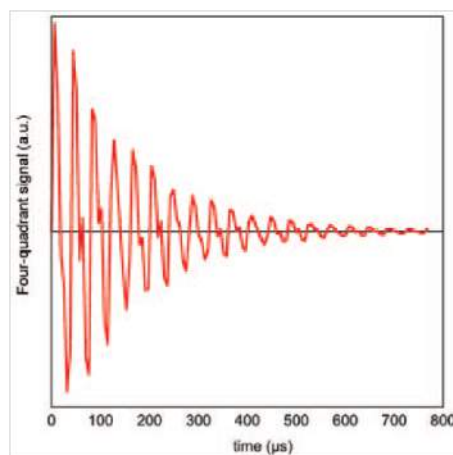


FIGURE 6.12 – Réponse temporelle du levier (cantilever) excité par l'augmentation de la température générée par un laser pulsé d'une nanoseconde.

Le signal AFM-IR subit par la suite une transformée de Fourier ce qui permet d'obtenir les différents modes d'excitation et leurs amplitudes (fig 6.13).

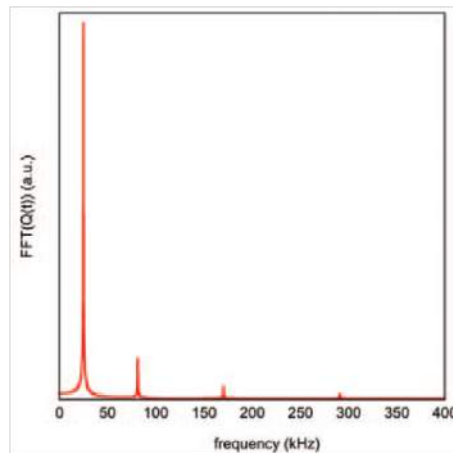


FIGURE 6.13 – Représentation du signal temporelle après analyse par transformée de Fourier.

L'analyse de Fourier montre que la réponse du cantilever et le produit de son mode de réponse multiplié par l'énergie induite par l'effet photothermique. Il y a une corrélation directe entre l'absorption de l'objet et le signal enregistré par la pointe de l'AFM. Les spectres IR de l'échantillon sont obtenus en enregistrant la variation du signal du détecteur en fonction du nombre d'onde.

La technique de nanospectroscopie infrarouge présente une grande avancée pour l'étude de phénomène nanoscopiques considérant la taille de la pointe AFM au contact de l'échantillon de l'ordre de quelques nanomètres.

### 6.6.6 L'AFM haute-vitesse

L'AFM haute-vitesse (*High-speed Atomic Force Microscope, HS-AFM*) (fig 6.14) est une technique innovante dont les derniers développements, menant au système actuel, ont émergé à la fin des années 2000. Cette technique récente résulte de l'évolution technologique du classique microscope à force atomique. L'HS-AFM permet d'observer à vitesse vidéo les dynamiques d'interaction et des changements structurel de molécules biologiques.

Le résolution nanométrique du microscope à force atomique et les conditions d'acquisition des images (milieu liquide, conditions physiologiques) en font une technique idéalement adaptée pour l'étude de phénomènes biologiques [263] [264] [245] [247].

Les principales évolutions liées à l'HS-AFM sont [246] :

- taille des leviers plus petite
- système de détection optique adapté aux petits leviers
- détecteurs d'amplitude rapides
- scanners piezoélectriques dont les axes de balayage ont été découplés
- système de contre-balancier sur l'axe de balayage z
- augmentation de la réactivité de la boucle de rétrocontrôle *via* une électronique repensée

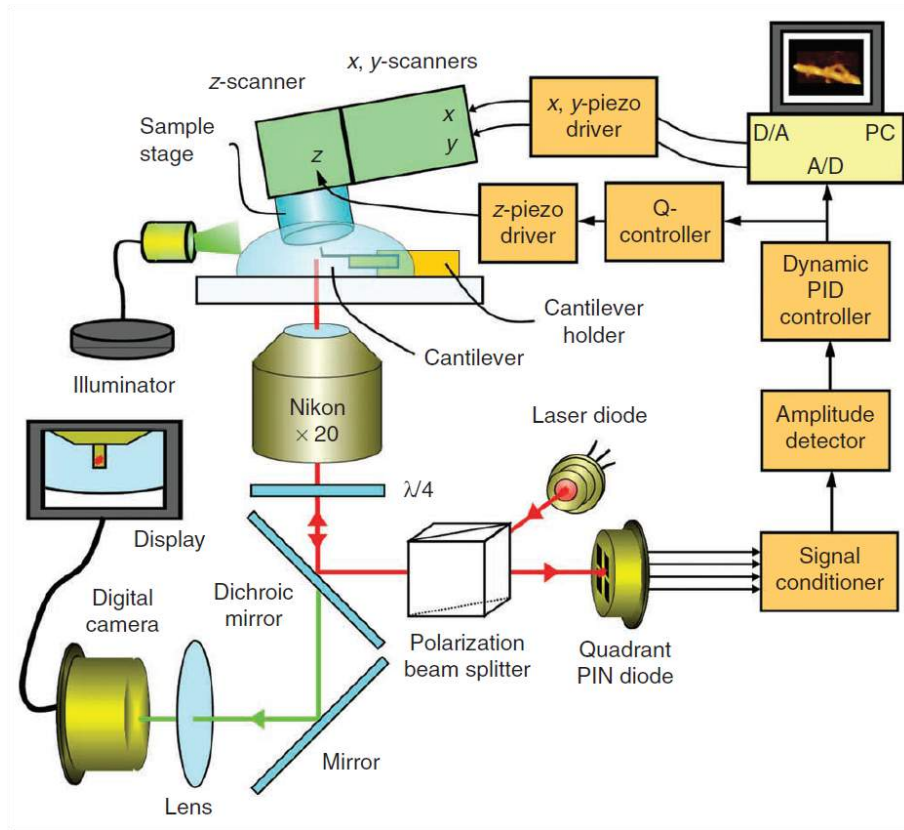


FIGURE 6.14 – Schéma du montage de l'AFM haute-vitesse.

Le microscope AFM haute-vitesse a la particularité d'avoir un système dit renversé : l'échantillon vient en vis-à-vis du microlevier. L'ensemble est immergé dans un environnement liquide assurant des conditions expérimentales adaptées au suivi de l'évolution de particules biologiques. Une croissance de surpointes en carbone suivie d'une gravure par un plasma d'argon-oxygène ont été réalisées préalablement sur les leviers. Ce procédé leur confère in fine un très faible rayon de courbure permettant ainsi une meilleure résolution que des leviers commerciaux.

## 6.7 Technologies microfluidiques

### 6.7.1 Propriétés physiques des systèmes miniaturisés

#### 6.7.1.1 Écoulement des fluides newtoniens

Les fluides newtoniens sont des fluides dont la viscosité dépend de la température et de la pression et ne dépend pas des forces extérieures qui agissent sur lui, ce qui concerne la majorité des fluides. Dans le cas d'un écoulement lent dans un tuyau de petit diamètre de ces fluides, l'écoulement suit la loi de Stokes et l'équation de Navier-Stokes [212] (éq 6.14) :

$$\frac{Dv}{Dt} = -\frac{1}{\rho}\nabla p + \eta\nabla^2 v + \frac{1}{\rho}F \quad (6.14)$$

Où  $F$  représente les forces extérieures exercées par unité de volume,  $p$  le champ de pression et

$\rho$  la densité du fluide.  $\eta = \mu/\rho$  est la viscosité cinématique du fluide, elle représente la capacité de rétention des particules du fluide (avec  $\mu$  la viscosité dynamique du fluide). La loi fondamentale de la conservation de la masse peut être décrite en mécanique des fluides par l'équation de continuité (éq 6.15) :

$$\frac{D\rho}{Dt} + \rho \operatorname{div}(v) = 0 \quad (6.15)$$

Qui, dans le cas des fluides incompressibles où la densité du fluide est invariante devient (éq 6.16) :

$$\operatorname{div}(v) = 0 \quad (6.16)$$

Ces propriétés impliquent que l'écoulement du fluide sera parallèle aux parois et que la pression ne varie pas dans l'épaisseur de l'écoulement. D'autre part, les frottements présent aux parois impliquent que le fluide ne glisse pas à leur contact et que donc la vitesse y est nulle. L'écoulement se produit selon un champ de vitesse adoptant une forme parabolique. Le champ de vitesse correspond dans notre cas à la vitesse moyenne des particules (fig 6.15).

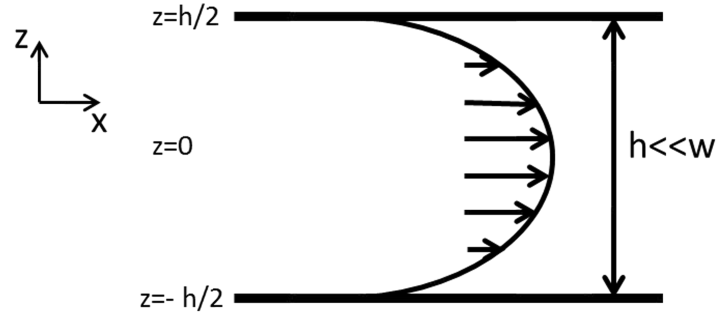


FIGURE 6.15 – Profil de vitesse d'un écoulement dans le canal [212]

Le théorème de  $\Pi$  permet de réduire un nombre effectif de variables d'un système et de prédire les conséquences de la miniaturisation. C'est ce théorème qui montre que les fluides stationnaires, incompressibles caractérisés par une unique échelle spatiale  $l$ , sont contrôlés par un nombre sans dimension le nombre de Reynolds.

### 6.7.1.2 Le nombre de Reynolds dans les microsystèmes

Le nombre de Reynolds (éq 6.17) mesure l'importance relative des forces inertielles liées à la vitesse et des forces de frottement liées à la viscosité. Il caractérise le régime du fluide : laminaire, transitoire ou turbulent.

$$Re = \frac{f_{\text{inertielles}}}{f_{\text{visqueuses}}} = \frac{\rho v L}{\eta} \quad (6.17)$$

Avec  $L$  la dimension caractéristique.

En microfluidique et d'après le théorème  $\Pi$ , on a  $v \sim L$  où la vitesse peut être estimée par la relation suivante (éq 6.18) :



$$v \sim \frac{\delta P l}{\mu} \quad (6.18)$$

où  $\mu$  est la densité du fluide,  $\delta P$  la différence de pression nécessaire pour induire le mouvement du fluide.  $\delta P$  dans les conditions microfluidiques est considéré comme étant constant on obtient donc une estimation du nombre de Reynolds dans ces conditions (éq 6.19) :

$$Re \sim l^2 \quad (6.19)$$

On en déduit donc que la miniaturisation tend à favoriser le bas nombre de Reynold ce qui correspond à négliger les forces inertielles par rapport aux forces de frottements. Dans ces conditions, l'écoulement du fluide est laminaire, l'équation de Stokes s'écrit (éq 6.20) :

$$-\frac{1}{\rho} \nabla p + \eta \delta v + \frac{1}{\rho} F = 0 \quad (6.20)$$

Dans les systèmes microfluidiques, le nombre de Reynolds n'excède pas  $10^{-1}$  [212].

### 6.7.1.3 Paramètres des écoulements dans une cellule microfluidique

La géométrie de la cellule que nous souhaitons développer peut être assimilable à la cellule d'Hele-Shaw. Il s'agit d'un dispositif expérimental permettant de modéliser le comportement des fluides en milieu confiné. La cellule d'Hele-Shaw est constituée de deux plaques parallèles séparées d'une distance plus petite que l'échelle de variation du champ de vitesse dans un plan parallèle aux plaques [212]. Cet écoulement est supposé se dérouler à bas nombre de Reynolds.

Le fluide s'écoule selon le plan (x, y), parallèlement aux plaques selon la loi de Poiseuille qui décrit l'écoulement laminaire d'un liquide visqueux dans un canal. On obtient l'équation du profil de vitesse suivante (éq 6.21) :

$$v(z) = v_{max} \left( 1 - \frac{z}{h/2} \right)^2 \quad (6.21)$$

Avec  $v_{max}$  la vitesse maximale à mi-hauteur du canal.

Le deuxième paramètre dont il faut tenir compte pour l'écoulement dans une cellule microfluidique est le phénomène de perte de charge. La perte de charge représente la différence de pression entre l'entrée et la sortie d'un canal droit de longueur  $L$  correspondant à l'énergie dissipée par les forces de frottements entre le liquide et les parois du canal.

La perte de charge dépend de la résistance hydrodynamique  $R_H$  du canal et du débit appliqué  $Q$  (éq 6.22) :

$$\delta P = \frac{12.L.\eta}{h^3.w} Q = R_H \quad (6.22)$$

La résistance hydrodynamique du système dépend donc des dimensions du canal (largeur (w), longueur (L) et hauteur (h)). Elle varie proportionnellement avec la viscosité ( $\eta$ ) du fluide

est augmente quand la hauteur du canal diminue.

Il est donc important d'en tenir compte lors de la conception du canal microfluidique, de trop faibles dimensions de canal pouvant entraîner le décollement des faces, mais l'épaisseur du canal ayant aussi un impact important sur le temps de diffusion des fluides dans le canal.

### 6.7.2 La question du mélange dans les systèmes miniaturisés

La question du mélange dans les systèmes microfluidiques est très importante car comme nous l'avons vu dans la section précédente, dans ces systèmes le nombre de Reynolds est si petit que les instabilités hydrodynamiques et les turbulences y sont inexistantes. L'origine microscopique du processus de diffusion vient du mouvement Brownien qui décrit la présence de collision entre les particules d'un milieu. Le premier modèle de diffusion des molécules proposé par Robert Brown n'était relevant que dans le cas du mélange de deux gaz. Dans le cas de particules se situant dans un fluide présentant une certaine viscosité, c'est la loi de Stokes-Einstein qui s'applique [212]. Elle permet d'estimer le coefficient de diffusion  $D$  d'une molécule (éq 6.23) :

$$D = \frac{kT}{6\pi R\eta} \quad (6.23)$$

Où  $k$  est la constante de Boltzmann,  $R$  le rayon des molécules diffusantes (assimilées à des sphères) et  $T$  la température.

Dans le cas des fluides, le coefficient de diffusion  $D$  est bien plus faible que dans le cas des gaz car la viscosité du milieu ralentit le déplacement des molécules. Tabeling, dans son ouvrage "Introduction to microfluidics" [212] répertorie les valeurs de coefficient de diffusion pour certaines molécules (table 6.2) :

Soluté	$D$ ( $cm^2.s^{-1}$ )
Eau	$10^{-5}$
Fluorescéine	$3 \times 10^{-5}$
Sucrose	$4,6 \times 10^{-6}$
Myosine	$1,2 \times 10^{-11}$

TABLE 6.2 – Valeurs de coefficients de diffusion des molécules dans l'eau à 20°C.

On peut noter que plus les molécules présentes dans le fluide sont grosses, plus leur coefficient de diffusion est petit car elles sont plus sujettes aux forces de friction de l'environnement liquide.

En terme de transport de molécule il existe deux modes : le transport par advection et le transport par diffusion. L'advection est le transport à la vitesse du milieu environnant et la diffusion est le transport relatif par rapport au milieu environnant en mouvement. Le nombre de Peclet mesure l'importance relative de l'advection comparé à la diffusion. Le nombre de Peclet (éq 6.24) est un nombre sans dimension qui permet de déterminer si le mélange peut être réalisé dans un canal :

$$Pe = \frac{vl}{D} \quad (6.24)$$

Avec  $v$  la vitesse caractéristique du fluide,  $l$  la largeur du canal et  $D$  le coefficient de diffusion.

Plus le nombre de Peclet est grand, plus l'influence de l'écoulement domine sur la diffusion moléculaire. Le nombre de Peclet varie comme  $l^2$ . Nous pouvons en déduire que dans les microsystèmes, le terme d'advection est négligeable, le mode de transport est donc uniquement gouverné par la diffusion.

En microfluidique, il n'existe pas d'ordre de grandeur caractéristique pour le nombre de Peclet. Si  $Pe$  est très faible, alors la diffusion est lente par rapport au déplacement du fluide dans le canal il faut donc une longue distance de canal pour obtenir un mélange homogène. Dans les systèmes microfluidiques le temps de diffusion est défini par (eq 6.25) :

$$t = \frac{l^2}{D} \quad (6.25)$$

L'étude de cinétiques de réaction en microfluidique peut être effectuée soit en faisant s'écouler deux fluides en parallèle (approche monophasique avec deux fluides miscibles l'un dans l'autre) soit par le biais de l'écoulement en gouttes (approche biphasique avec deux fluides immiscibles) [224]. Pour l'étude de la cinétique d'auto-assemblage du peptide  $A\beta_{1-42}$ , nous avons choisi d'utiliser l'approche monophasique par co-écoulement de deux solutions aqueuses en parallèle. La cellule microfluidique a donc été conçue pour répondre à ces exigences.

# Bibliographie

- [1] Christian Haass and Dennis J. Selkoe. Soluble protein oligomers in neurodegeneration : lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(2) :101–112, February 2007.
- [2] Rakez Kaye, Elizabeth Head, Jennifer L. Thompson, Theresa M. McIntire, Saskia C. Milton, Carl W. Cotman, and Charles G. Glabe. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science*, 300(5618) :486–489, April 2003.
- [3] James C. Stroud, Cong Liu, Poh K. Teng, and David Eisenberg. Toxic fibrillar oligomers of amyloid-beta have cross-beta structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 109(20) :7717–7722, May 2012.
- [4] Rabia Sarroukh, Erik Goormaghtigh, Jean-Marie Ruyschaert, and Vincent Raussens. ATR-FTIR : a "rejuvenated" tool to investigate amyloid proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1828(10) :2328–2338, October 2013.
- [5] Helene Vignaud, Claude Bobo, Ioan Lascu, Karin Margareta Sorgjerd, Tamotsu Zako, Mizuo Maeda, Benedicte Salin, Sophie Lecomte, and Christophe Cullin. A structure-toxicity study of Abeta42 reveals a new anti-parallel aggregation pathway. *PLoS ONE*, 8(11) :e80262, 2013.
- [6] Cong Liu, Minglei Zhao, Lin Jiang, Pin-Nan Cheng, Jiyong Park, Michael R. Sawaya, Anna Pensalfini, Dawei Gou, Arnold J. Berk, Charles G. Glabe, James Nowick, and David Eisenberg. Out-of-register beta-sheets suggest a pathway to toxic amyloid aggregates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 109(51) :20913–20918, December 2012.
- [7] Dominic M. Walsh, Eva Thulin, Aed  n M. Minogue, Niklas Gustavsson, Eric Pang, David B. Teplow, and Sara Linse. A facile method for expression and purification of the Alzheimer's disease-associated amyloid beta-peptide. *FEBS J.*, 276(5) :1266–1281, March 2009.
- [8] Karine Berthelot, Christophe Cullin, and Sophie Lecomte. What does make an amyloid toxic : morphology, structure or interaction with membrane ? *Biochimie*, 95(1) :12–19, January 2013.
- [9] Emilie Cerf, Rabia Sarroukh, Shiori Tamamizu-Kato, Leonid Breydo, Sylvie Derclaye, Yves F. Dufrene, Vasanthy Narayanaswami, Erik Goormaghtigh, Jean-Marie Ruyschaert, and Vincent Raussens. Antiparallel beta-sheet : a signature structure of the oligomeric amyloid beta-peptide. *Biochem. J.*, 421(3) :415–423, August 2009.

- [10] Wei Qiang, Wai-Ming Yau, Yongquan Luo, Mark P. Mattson, and Robert Tycko. Antiparallel beta-sheet architecture in Iowa-mutant beta-amyloid fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 109(12) :4443–4448, March 2012.
- [11] Maria Soledad Celej, Rabia Sarroukh, Erik Goormaghtigh, Gerardo D. Fidelio, Jean-Marie Ruysschaert, and Vincent Raussens. Toxic prefibrillar alpha-synuclein amyloid oligomers adopt a distinctive antiparallel beta-sheet structure. *Biochem. J.*, 443(3) :719–726, May 2012.
- [12] Thomas L. Williams and Louise C. Serpell. Membrane and surface interactions of Alzheimer’s A $\beta$  peptide—insights into the mechanism of cytotoxicity. *FEBS J.*, 278(20) :3905–3917, October 2011.
- [13] Sara M. Butterfield and Hilal A. Lashuel. Amyloidogenic protein-membrane interactions : mechanistic insight from model systems. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 49(33) :5628–5654, August 2010.
- [14] Samuel A. Kotler, Patrick Walsh, Jeffrey R. Brender, and Ayyalusamy Ramamoorthy. Differences between amyloid-beta aggregation in solution and on the membrane : insights into elucidation of the mechanistic details of Alzheimer’s disease. *Chem Soc Rev*, 43(19) :6692–6700, October 2014.
- [15] Hilal A. Lashuel. Membrane Permeabilization : A Common Mechanism in Protein-Misfolding Diseases. *Sci. Aging Knowl. Environ.*, 2005(38) :pe28, September 2005.
- [16] Michele F. M. Sciacca, Samuel A. Kotler, Jeffrey R. Brender, Jennifer Chen, Dong-kuk Lee, and Ayyalusamy Ramamoorthy. Two-step mechanism of membrane disruption by A $\beta$  through membrane fragmentation and pore formation. *Biophys. J.*, 103(4) :702–710, August 2012.
- [17] S. Y. Tan and M. B. Pepys. Amyloidosis. *Histopathology*, 25(5) :403–414, November 1994.
- [18] J. D. Sipe and A. S. Cohen. Review : history of the amyloid fibril. *J. Struct. Biol.*, 130(2-3) :88–98, June 2000.
- [19] Per Westermark. Amyloidosis and Amyloid Proteins : Brief History and Definitions. In Jean D. Sipe, editor, *Amyloid Proteins*, pages 2–27. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2005.
- [20] M. Pras Schubert, M., D. Zucker-Franklin, A. Rimon, and E. C. Franklin. The characterization of soluble amyloid prepared in water. *J Clin Invest*, 47(4) :924–933, April 1968.
- [21] Jean D. Sipe, Merrill D. Benson, Joel N. Buxbaum, Shu-Ichi Ikeda, Giampaolo Merlini, Maria J. M. Saraiva, and Per Westermark. Amyloid fibril protein nomenclature : 2010 recommendations from the nomenclature committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid*, 17(3-4) :101–104, September 2010.
- [22] S B Prusiner. Biology and Genetics of Prion Diseases. *Annual Review of Microbiology*, 48(1) :655–686, 1994.
- [23] Stanley B. Prusiner. Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(23) :13363–13383, November 1998.
- [24] Philippe Amouyel. Alzheimer, July 2014.

- 
- [25] Martin Prince, Anders Wimo, Maelenn Guerchet, Gemma-Claire Ali, Yu-Tzu Wu, and Matthew Prina. World Alzheimer Report 2015 : The Global Impact of Dementia | Alzheimer's Disease International. Technical report, Alzheimer's Disease International, August 2015.
- [26] David H. Small and Roberto Cappai. Alois Alzheimer and Alzheimer's disease : a centennial perspective. *J. Neurochem.*, 99(3) :708–710, November 2006.
- [27] Rainulf A. Stelzmann, H. Norman Schnitzlein, and F. Reed Murtagh. An english translation of alzheimer's 1907 paper, "uber eine eigenartige erkankung der hirnrinde". *Clin. Anat.*, 8(6) :429–431, January 1995.
- [28] Rudy J. Castellani, Raj K. Rolston, and Mark A. Smith. Alzheimer disease. *Dis Mon*, 56(9) :484–546, September 2010.
- [29] Carol Brayne, Kathryn Richardson, Fiona E. Matthews, Jane Fleming, Sally Hunter, John H. Xuereb, Eugene Paykel, Elizabeta B. Mukaetova-Ladinska, Felicia A. Huppert, Angela O'Sullivan, Tom Denning, and Cambridge City Over-75s Cohort Cc75c Study Neuropathology Collaboration. Neuropathological correlates of dementia in over-80-year-old brain donors from the population-based Cambridge city over-75s cohort (CC75c) study. *J. Alzheimers Dis.*, 18(3) :645–658, 2009.
- [30] J. P. Brion. Neurofibrillary tangles and Alzheimer's disease. *Eur. Neurol.*, 40(3) :130–140, October 1998.
- [31] Kailie Luan, Jesusa L. Rosales, and Ki-Young Lee. Viewpoint : Crosstalks between neurofibrillary tangles and amyloid plaque formation. *Ageing Res. Rev.*, 12(1) :174–181, January 2013.
- [32] Peter T. Nelson, Heiko Braak, and William R. Markesbery. Neuropathology and cognitive impairment in Alzheimer disease : a complex but coherent relationship. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 68(1) :1–14, January 2009.
- [33] Abbas Ali Mahdi, Sandeep Tripathi, Jayanti Neerja, and Mahdi Hasan. Aluminium Mediated Oxidative Stress : Possible Relationship to Cognitive Impairment of Alzheimer's Type. *Annals of Neurosciences*, 13(1) :18–24, February 2010.
- [34] Z. S. Khachaturian. Diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch. Neurol.*, 42(11) :1097–1105, November 1985.
- [35] C. L. Joachim and D. J. Selkoe. Amyloid protein in Alzheimer's disease. *J Gerontol*, 44(4) :B77–82, July 1989.
- [36] J. Hardy and D. Allsop. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol. Sci.*, 12(10) :383–388, October 1991.
- [37] J. Hardy. An 'anatomical cascade hypothesis' for Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.*, 15(6) :200–201, June 1992.
- [38] D. J. Selkoe. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron*, 6(4) :487–498, April 1991.

- [39] Sagar H. Barage and Kailas D. Sonawane. Amyloid cascade hypothesis : Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides*, 52 :1–18, August 2015.
- [40] John Hardy and Dennis J. Selkoe. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease : progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297(5580) :353–356, July 2002.
- [41] R. A. Armstrong. A critical analysis of the 'amyloid cascade hypothesis'. *Folia Neuropathol*, 52(3) :211–225, 2014.
- [42] Michael A. Castello and Salvador Soriano. On the origin of Alzheimer's disease. Trials and tribulations of the amyloid hypothesis. *Ageing Res. Rev.*, 13 :10–12, January 2014.
- [43] John Hardy. The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease : a critical reappraisal. *J. Neurochem.*, 110(4) :1129–1134, August 2009.
- [44] J. Kang, H. G. Lemaire, A. Unterbeck, J. M. Salbaum, C. L. Masters, K. H. Grzeschik, G. Multhaup, K. Beyreuther, and B. Muller-Hill. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, 325(6106) :733–736, February 1987.
- [45] Paul R Turner, Kate OConnor, Warren P Tate, and Wickliffe C Abraham. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Progress in Neurobiology*, 70(1) :1–32, May 2003.
- [46] D. J. Selkoe, M. B. Podlisny, C. L. Joachim, E. A. Vickers, G. Lee, L. C. Fritz, and T. Oltersdorf. Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85(19) :7341–7345, October 1988.
- [47] D. J. Selkoe. Cell biology of the amyloid beta-protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 10 :373–403, 1994.
- [48] Yue Qi-Takahara, Maho Morishima-Kawashima, Yu Tanimura, Georgia Dolios, Naoko Hirotsani, Yuko Horikoshi, Fuyuki Kametani, Masahiro Maeda, Takaomi C. Saido, Rong Wang, and Yasuo Ihara. Longer forms of amyloid beta protein : implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase. *J. Neurosci.*, 25(2) :436–445, January 2005.
- [49] J. Naslund, A. Schierhorn, U. Hellman, L. Lannfelt, A. D. Roses, L. O. Tjernberg, J. Silverring, S. E. Gandy, B. Winblad, and P. Greengard. Relative abundance of Alzheimer A beta amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging. *PNAS*, 91(18) :8378–8382, August 1994.
- [50] Matthias Schmidt, Carsten Sachse, Walter Richter, Chen Xu, Marcus F&Ouml;ndrich, and Nikolaus Grigorieff. Comparison of Alzheimer Abeta(1-40) and Abeta(1-42) amyloid fibrils reveals similar protofilament structures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(47) :19813–19818, November 2009.
- [51] A E Roher, J D Lowenson, S Clarke, A S Woods, R J Cotter, E Gowing, and M J Ball. beta-Amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits : implications for the pathology of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(22) :10836–10840, November 1993.

- 
- [52] Thomas R. Jahn and Sheena E. Radford. Folding versus aggregation : polypeptide conformations on competing pathways. *Arch. Biochem. Biophys.*, 469(1) :100–117, January 2008.
- [53] Christopher A. Ross and Michelle A. Poirier. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat. Med.*, 10 Suppl :S10–17, July 2004.
- [54] Cyrus Levinthal. Are there pathways for protein folding. *J. Chim. phys.*, 65(1) :44–45, 1968.
- [55] A. R. Fersht. Nucleation mechanisms in protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 7(1) :3–9, February 1997.
- [56] K. A. Dill and H. S. Chan. From Levinthal to pathways to funnels. *Nat. Struct. Biol.*, 4(1) :10–19, January 1997.
- [57] P. G. Wolynes, J. N. Onuchic, and D. Thirumalai. Navigating the folding routes. *Science*, 267(5204) :1619–1620, March 1995.
- [58] Christopher M. Dobson. Protein folding and misfolding. *Nature*, 426(6968) :884–890, December 2003.
- [59] Amit Kumar, Lea C. Paslay, Daniel Lyons, Sarah E. Morgan, John J. Correia, and Vijayaraghavan Rangachari. Specific soluble oligomers of amyloid-beta peptide undergo replication and form non-fibrillar aggregates in interfacial environments. *J. Biol. Chem.*, 287(25) :21253–21264, June 2012.
- [60] R. S. Harrison, P. C. Sharpe, Y. Singh, and D. P. Fairlie. Amyloid peptides and proteins in review. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 159 :1–77, 2007.
- [61] Melanie R. Nilsson. Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods*, 34(1) :151–160, September 2004.
- [62] James D. Harper and Peter T. Lansbury. Models of Amyloid seeding in Alzheimer’s disease and scrapie :Mechanistic Truths and Physiological Consequences of the Time-Dependent Solubility of Amyloid Proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 66(1) :385–407, 1997.
- [63] Joel N. Buxbaum. Diseases of protein conformation : what do in vitro experiments tell us about in vivo diseases ? *Trends Biochem. Sci.*, 28(11) :585–592, November 2003.
- [64] Jinghui Luo, Sebastian K. T. S. Warmlander, Astrid Graslund, and Jan Pieter Abrahams. Alzheimer peptides aggregate into transient nanoglobules that nucleate fibrils. *Biochemistry*, 53(40) :6302–6308, October 2014.
- [65] H. Naiki, K. Higuchi, M. Hosokawa, and T. Takeda. Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1. *Anal. Biochem.*, 177(2) :244–249, March 1989.
- [66] H. Naiki, K. Higuchi, K. Matsushima, A. Shimada, W. H. Chen, M. Hosokawa, and T. Takeda. Fluorometric examination of tissue amyloid fibrils in murine senile amyloidosis : use of the fluorescent indicator, thioflavine T. *Lab. Invest.*, 62(6) :768–773, June 1990.
- [67] M. R. H. Krebs, E. H. C. Bromley, and A. M. Donald. The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils : localisation and implications. *J. Struct. Biol.*, 149(1) :30–37, January 2005.



- [68] H. LeVine. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides : detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci.*, 2(3) :404–410, March 1993.
- [69] David P. Steensma. "Congo" Red. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 125(2) :250–252, February 2001.
- [70] D. R. Morey. Dichroism of Dyed Fibres as a Means of Studying Micellar Arrangement. *Textile Research Journal*, 5(2) :105–109, January 1934.
- [71] A. S. Cohen, E. Calkins, and C. I. Levene. Studies on experimental amyloidosis. I. Analysis of histology and staining reactions of casein-induced amyloidosis in the rabbit. *Am. J. Pathol.*, 35 :971–989, October 1959.
- [72] H. Puchtler and F. Sweat. Congo red as a stain for fluorescence microscopy of amyloid. *J. Histochem. Cytochem.*, 13(8) :693–694, December 1965.
- [73] Holde Puchtler, Faye Sweat, and M. Levine. On the Binding of Congo Red by Amyloid. *J Histochem Cytochem*, 10(3) :355–364, January 1962.
- [74] Petrea Frid, Sergey V. Anisimov, and Natalija Popovic. Congo red and protein aggregation in neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev*, 53(1) :135–160, January 2007.
- [75] G. G. Glenner, E. D. Eanes, and D. L. Page. The relation of the properties of Congo red-stained amyloid fibrils to the beta-conformation. *J. Histochem. Cytochem.*, 20(10) :821–826, October 1972.
- [76] O. Sumner Makin and Louise C. Serpell. Structures for amyloid fibrils. *FEBS J.*, 272(23) :5950–5961, December 2005.
- [77] Maarit Tanskanen. "Amyloid" - Historical Aspects. In Dali Feng, editor, *Amyloidosis*. InTech, June 2013.
- [78] A. J. Geddes, K. D. Parker, E. D. Atkins, and E. Beighton. "Cross-beta" conformation in proteins. *J. Mol. Biol.*, 32(2) :343–358, March 1968.
- [79] E. D. Eanes and G. G. Glenner. X-ray diffraction studies on amyloid filaments. *J. Histochem. Cytochem.*, 16(11) :673–677, November 1968.
- [80] A. S. Cohen and E. Calkins. Electron microscopic observations on a fibrous component in amyloid of diverse origins. *Nature*, 183(4669) :1202–1203, April 1959.
- [81] M. Sunde, L. C. Serpell, M. Bartlam, P. E. Fraser, M. B. Pepys, and C. C. Blake. Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J. Mol. Biol.*, 273(3) :729–739, October 1997.
- [82] L. C. Serpell. Alzheimer's amyloid fibrils : structure and assembly. *Biochim. Biophys. Acta*, 1502(1) :16–30, July 2000.
- [83] M. R. Nilsson and D. P. Raleigh. Analysis of amylin cleavage products provides new insights into the amyloidogenic region of human amylin. *J. Mol. Biol.*, 294(5) :1375–1385, December 1999.
- [84] Thorsten Luhers, Christiane Ritter, Marc Adrian, Dominique Riek-Loher, Bernd Bohrmann, Heinz Dobeli, David Schubert, and Roland Riek. 3d structure of Alzheimer's amyloid-beta(1-42) fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102(48) :17342–17347, November 2005.

- 
- [85] Claire Goldsbury, Ulrich Baxa, Martha N. Simon, Alasdair C. Steven, Andreas Engel, Joseph S. Wall, Ueli Aepli, and Shirley A. Möller. Amyloid structure and assembly : insights from scanning transmission electron microscopy. *J. Struct. Biol.*, 173(1) :1–13, January 2011.
- [86] D. Hermann, M. Both, U. Ebert, G. Gross, H. Schoemaker, A. Draguhn, K. Wicke, and V. Nimmrich. Synaptic transmission is impaired prior to plaque formation in amyloid precursor protein-overexpressing mice without altering behaviorally-correlated sharp wave-ripple complexes. *Neuroscience*, 162(4) :1081–1090, September 2009.
- [87] J. Larson, G. Lynch, D. Games, and P. Seubert. Alterations in synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampal slices from young and aged PDAPP mice. *Brain Res.*, 840(1-2) :23–35, September 1999.
- [88] Marco Diociaiuti, Gianfranco Macchia, Silvia Paradisi, Claudio Frank, Serena Camerini, Pietro Chistolini, Maria Cristina Gaudiano, Tamara Corinna Petrucci, and Fiorella Malchiodi-Albedi. Native metastable prefibrillar oligomers are the most neurotoxic species among amyloid aggregates. *Biochim. Biophys. Acta*, 1842(9) :1622–1629, September 2014.
- [89] Jiyong Lee, Elizabeth K. Culyba, Evan T. Powers, and Jeffery W. Kelly. Amyloid-beta forms fibrils by nucleated conformational conversion of oligomers. *Nat. Chem. Biol.*, 7(9) :602–609, September 2011.
- [90] D. Burdick, B. Soreghan, M. Kwon, J. Kosmoski, M. Knauer, A. Henschen, J. Yates, C. Cotman, and C. Glabe. Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer’s A4/beta amyloid peptide analogs. *J. Biol. Chem.*, 267(1) :546–554, January 1992.
- [91] W. Garzon-Rodriguez, M. Sepulveda-Becerra, S. Milton, and C. G. Glabe. Soluble amyloid Abeta-(1-40) exists as a stable dimer at low concentrations. *J. Biol. Chem.*, 272(34) :21037–21044, August 1997.
- [92] Hilal A. Lashuel, Dean Hartley, Benjamin M. Petre, Thomas Walz, and Peter T. Lansbury. Neurodegenerative disease : amyloid pores from pathogenic mutations. *Nature*, 418(6895) :291, July 2002.
- [93] Charles G. Glabe. Amyloid oligomer structures and toxicity. *Open Biol. J.*, 2 :222–227, 2009.
- [94] Linda A. Kotilinek, Brian Bacskai, Marcus Westerman, Takeshi Kowarabayashi, Linda Younkin, Bradley T. Hyman, Steven Younkin, and Karen H. Ashe. Reversible memory loss in a mouse transgenic model of Alzheimer’s disease. *J. Neurosci.*, 22(15) :6331–6335, August 2002.
- [95] Anders Sandberg, Leila M. Luheshi, Sofia Sollvander, Teresa Pereira de Barros, Bertil Macao, Tuomas P. J. Knowles, Henrik Biverstal, Christofer Lendel, Frida Ekholm-Petterson, Anatoly Dubnovitsky, Lars Lannfelt, Christopher M. Dobson, and Torleif Hard. Stabilization of neurotoxic Alzheimer amyloid-beta oligomers by protein engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107(35) :15595–15600, August 2010.

- [96] Karine Berthelot, Ha Phuong Ta, Julie Gean, Sophie Lecomte, and Christophe Cullin. In vivo and in vitro analyses of toxic mutants of HET-s : FTIR antiparallel signature correlates with amyloid toxicity. *J. Mol. Biol.*, 412(1) :137–152, September 2011.
- [97] D. H. J. Lopes, A. Meister, A. Gohlke, A. Hauser, A. Blume, and R. Winter. Mechanism of islet amyloid polypeptide fibrillation at lipid interfaces studied by infrared reflection absorption spectroscopy. *Biophys. J.*, 93(9) :3132–3141, November 2007.
- [98] Dean L. Pountney, Nicolas H. Voelcker, and Wei Ping Gai. Annular alpha-synuclein oligomers are potentially toxic agents in alpha-synucleinopathy. Hypothesis. *Neurotox Res*, 7(1-2) :59–67, 2005.
- [99] Leena Haataja, Tatyana Gurlo, Chang J. Huang, and Peter C. Butler. Islet amyloid in type 2 diabetes, and the toxic oligomer hypothesis. *Endocr. Rev.*, 29(3) :303–316, May 2008.
- [100] Liping Yu, Rohinton Edalji, John E. Harlan, Thomas F. Holzman, Ana Pereda Lopez, Boris Labkovsky, Heinz Hillen, Stefan Barghorn, Ulrich Ebert, Paul L. Richardson, Laura Miesbauer, Larry Solomon, Diane Bartley, Karl Walter, Robert W. Johnson, Philip J. Hajduk, and Edward T. Olejniczak. Structural characterization of a soluble amyloid beta-peptide oligomer. *Biochemistry*, 48(9) :1870–1877, March 2009.
- [101] Anne Eckert, Susanne Hauptmann, Isabel Scherping, Jessica Meinhardt, Virginie Rhein, Stefan Drose, Ulrich Brandt, Marcus Fandrich, Walter E. Muller, and Jurgen Gotz. Oligomeric and fibrillar species of beta-amyloid (A beta 42) both impair mitochondrial function in P301l tau transgenic mice. *J. Mol. Med.*, 86(11) :1255–1267, November 2008.
- [102] State of aggregation. *Nat Neurosci*, 14(4) :399–399, April 2011.
- [103] M. P. Lambert, A. K. Barlow, B. A. Chromy, C. Edwards, R. Freed, M. Liosatos, T. E. Morgan, I. Rozovsky, B. Trommer, K. L. Viola, P. Wals, C. Zhang, C. E. Finch, G. A. Krafft, and W. L. Klein. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A-beta 1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(11) :6448–6453, May 1998.
- [104] Wolfgang Hoyer, Caroline Gronwall, Andreas Jonsson, Stefan Stahl, and Torleif Hard. Stabilization of a beta-hairpin in monomeric Alzheimer’s amyloid-beta peptide inhibits amyloid formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105(13) :5099–5104, April 2008.
- [105] G. Bitan, A. Lomakin, and D. B. Teplow. Amyloid beta-protein oligomerization : pre-nucleation interactions revealed by photo-induced cross-linking of unmodified proteins. *J. Biol. Chem.*, 276(37) :35176–35184, September 2001.
- [106] Kazuma Murakami, Kazuhiro Irie, Akira Morimoto, Hajime Ohgashi, Mayumi Shindo, Masaya Nagao, Takahiko Shimizu, and Takuji Shirasawa. Synthesis, aggregation, neurotoxicity, and secondary structure of various A beta 1-42 mutants of familial Alzheimer’s disease at positions 21-23. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 294(1) :5–10, May 2002.
- [107] Nicolas Lux Fawzi, Kevin L. Kohlstedt, Yuka Okabe, and Teresa Head-Gordon. Protofibril assemblies of the arctic, Dutch, and Flemish mutants of the Alzheimer’s Abeta1-40 peptide. *Biophys. J.*, 94(6) :2007–2016, March 2008.

- 
- [108] Igor Klyubin, Dominic M. Walsh, William K. Cullen, Julia V. Fadeeva, Roger Anwyl, Dennis J. Selkoe, and Michael J. Rowan. Soluble Arctic amyloid beta protein inhibits hippocampal long-term potentiation in vivo. *Eur. J. Neurosci.*, 19(10) :2839–2846, May 2004.
  - [109] V. Hines, W. Zhang, N. Ramakrishna, J. Styles, P. Mehta, K. S. Kim, M. Innis, and D. L. Miller. The expression and processing of human beta-amyloid peptide precursors in *Saccharomyces cerevisiae* : evidence for a novel endopeptidase in the yeast secretory system. *Cell. Mol. Biol. Res.*, 40(4) :273–284, 1994.
  - [110] Jo Caine, Sonia Sankovich, Helma Antony, Lynne Waddington, Peter Macreadie, Jose Varghese, and Ian Macreadie. Alzheimer’s Abeta fused to green fluorescent protein induces growth stress and a heat shock response. *FEMS Yeast Res.*, 7(8) :1230–1236, December 2007.
  - [111] Fabien D’Angelo, Helene Vignaud, Julie Di Martino, BÃ©nÃ©dicte Salin, Anne Devin, Christophe Cullin, and Christelle Marchal. A yeast model for amyloid-beta aggregation exemplifies the role of membrane trafficking and PICALM in cytotoxicity. *Dis Model Mech.*, 6(1) :206–216, January 2013.
  - [112] S. J. Singer and G. L. Nicolson. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175(4023) :720–731, February 1972.
  - [113] Garth L. Nicolson. The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure : still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochim. Biophys. Acta*, 1838(6) :1451–1466, June 2014.
  - [114] G. Vereb, J. Szollosi, J. Matko, P. Nagy, T. Farkas, L. Vigh, L. Matyus, T. A. Waldmann, and S. Damjanovich. Dynamic, yet structured : The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100(14) :8053–8058, July 2003.
  - [115] Sietze Reitsma, Dick W. Slaaf, Hans Vink, Marc A. M. J. van Zandvoort, and Mirjam G. A. oude Egbrink. The endothelial glycocalyx : composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch.*, 454(3) :345–359, June 2007.
  - [116] P. S. Sastry. Lipids of nervous tissue : composition and metabolism. *Prog. Lipid Res.*, 24(2) :69–176, 1985.
  - [117] Alba Naudi, Rosanna Cabre, Mariona Jove, Victoria Ayala, Hugo Gonzalo, Manuel Portero-Otin, Isidre Ferrer, and Reinald Pamplona. Lipidomics of Human Brain Aging and Alzheimer’s Disease Pathology. *Int. Rev. Neurobiol.*, 122 :133–189, 2015.
  - [118] Robert B. Gennis. Introduction : The Structure and Composition of Biomembranes. In *Biomembranes*, Springer Advanced Texts in Chemistry, pages 1–35. Springer New York, 1989.
  - [119] James A. Hebda and Andrew D. Miranker. The interplay of catalysis and toxicity by amyloid intermediates on lipid bilayers : insights from type II diabetes. *Annu Rev Biophys.*, 38 :125–152, 2009.
  - [120] Christopher Aisenbrey, Tomasz Borowik, Roberth Bystrom, Marcus Bokvist, Fredrick Lindstrom, Hanna Misiak, Marc-Antoine Sani, and Gerhard Grobner. How is protein aggre-

- gation in amyloidogenic diseases modulated by biological membranes? *Eur. Biophys. J.*, 37(3) :247–255, March 2008.
- [121] Maria Andreassen, Nikolai Lorenzen, and Daniel Otzen. Interactions between misfolded protein oligomers and membranes : A central topic in neurodegenerative diseases? *Biochim. Biophys. Acta*, 1848(9) :1897–1907, September 2015.
- [122] N. Arispe, E. Rojas, and H. B. Pollard. Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes : blockade by tromethamine and aluminum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90(2) :567–571, January 1993.
- [123] Hai-Young Kim, Min-Kyu Cho, Ashutosh Kumar, Elke Maier, Carsten Siebenhaar, Stefan Becker, Claudio O. Fernandez, Hilal A. Lashuel, Roland Benz, Adam Lange, and Markus Zweckstetter. Structural Properties of Pore-Forming Oligomers of alpha-Synuclein. *J. Am. Chem. Soc.*, 131(47) :17482–17489, December 2009.
- [124] Angelo Demuro, Erene Mina, Rakez Kaye, Saskia C. Milton, Ian Parker, and Charles G. Glabe. Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J. Biol. Chem.*, 280(17) :17294–17300, April 2005.
- [125] H. Lin, R. Bhatia, and R. Lal. Amyloid beta protein forms ion channels : implications for Alzheimer’s disease pathophysiology. *FASEB J.*, 15(13) :2433–2444, November 2001.
- [126] Li Na Zhao, Honwai Long, Yuguang Mu, and Lock Yue Chew. The toxicity of amyloid beta oligomers. *Int J Mol Sci*, 13(6) :7303–7327, 2012.
- [127] Jacques Fantini, Nouara Yahi, and Nicolas Garmy. Cholesterol accelerates the binding of Alzheimer’s beta-amyloid peptide to ganglioside GM1 through a universal hydrogen-bond-dependent sterol tuning of glycolipid conformation. *Front Physiol*, 4 :120, 2013.
- [128] Antonio Valencia, Patrick B. Reeves, Ellen Sapp, Xueyi Li, Jonathan Alexander, Kimberly B. Kegel, Kathryn Chase, Neil Aronin, and Marian DiFiglia. Mutant huntingtin and glycogen synthase kinase 3-beta accumulate in neuronal lipid rafts of a presymptomatic knock-in mouse model of Huntington’s disease. *J. Neurosci. Res.*, 88(1) :179–190, January 2010.
- [129] Marco Diociaiuti, Laura Zanetti Polzi, Luisa Valvo, Fiorella Malchiodi-Albedi, Cecilia Bombelli, and Maria Cristina Gaudiano. Calcitonin forms oligomeric pore-like structures in lipid membranes. *Biophys. J.*, 91(6) :2275–2281, September 2006.
- [130] Jo V. Rushworth and Nigel M. Hooper. Lipid Rafts : Linking Alzheimer’s Amyloid-beta Production, Aggregation, and Toxicity at Neuronal Membranes. *Int J Alzheimers Dis*, 2011 :603052, 2010.
- [131] Monica Bucciantini, Stefania Rigacci, and Massimo Stefani. Amyloid Aggregation : Role of Biological Membranes and the Aggregate-Membrane System. *J Phys Chem Lett*, 5(3) :517–527, February 2014.
- [132] Narinder Sanghera, Bruno E. F. S. Correia, Joana R. S. Correia, Christian Ludwig, Sonya Agarwal, Hironori K. Nakamura, Kazuo Kuwata, Eric Samain, Andrew C. Gill, Boyan B. Bonev, and Teresa J. T. Pinheiro. Deciphering the molecular details for the binding of the

- prion protein to main ganglioside GM1 of neuronal membranes. *Chem. Biol.*, 18(11) :1422–1431, November 2011.
- [133] Vittorio Maglione, Paolo Marchi, Alba Di Pardo, Susanne Lingrell, Melanie Horkey, Emily Tidmarsh, and Simonetta Sipione. Impaired ganglioside metabolism in Huntington’s disease and neuroprotective role of GM1. *J. Neurosci.*, 30(11) :4072–4080, March 2010.
  - [134] Katsumi Matsuzaki, Koichi Kato, and Katsuhiko Yanagisawa. Abeta polymerization through interaction with membrane gangliosides. *Biochim. Biophys. Acta*, 1801(8) :868–877, August 2010.
  - [135] Kenichi Mori, Md Iqbal Mahmood, Saburo Neya, Katsumi Matsuzaki, and Tyuji Hoshino. Formation of GM1 ganglioside clusters on the lipid membrane containing sphingomyeline and cholesterol. *J Phys Chem B*, 116(17) :5111–5121, May 2012.
  - [136] R. P. Mason, W. J. Shoemaker, L. Shajenko, T. E. Chambers, and L. G. Herbette. Evidence for changes in the Alzheimer’s disease brain cortical membrane structure mediated by cholesterol. *Neurobiol. Aging*, 13(3) :413–419, June 1992.
  - [137] Andrew J. Beel, Charles K. Mobley, Hak Jun Kim, Fang Tian, Arina Hadziselimovic, Bing Jap, James H. Prestegard, and Charles R. Sanders. Structural studies of the transmembrane C-terminal domain of the amyloid precursor protein (APP) : does APP function as a cholesterol sensor ? *Biochemistry*, 47(36) :9428–9446, September 2008.
  - [138] Maria Dolores Ledesma and Carlos G. Dotti. Amyloid excess in Alzheimer’s disease : what is cholesterol to be blamed for ? *FEBS Lett.*, 580(23) :5525–5532, October 2006.
  - [139] T. Valdes-Gonzalez, J. Inagawa, and T. Ido. Neuropeptides interact with glycolipid receptors : a surface plasmon resonance study. *Peptides*, 22(7) :1099–1106, July 2001.
  - [140] L. P. Choo-Smith, W. Garzon-Rodriguez, C. G. Glabe, and W. K. Surewicz. Acceleration of amyloid fibril formation by specific binding of Abeta-(1-40) peptide to ganglioside-containing membrane vesicles. *J. Biol. Chem.*, 272(37) :22987–22990, September 1997.
  - [141] Annalisa Relini, Ornella Cavalleri, Ranieri Rolandi, and Alessandra Gliozzi. The two-fold aspect of the interplay of amyloidogenic proteins with lipid membranes. *Chem. Phys. Lipids*, 158(1) :1–9, March 2009.
  - [142] V. Koppaka and P. H. Axelsen. Accelerated accumulation of amyloid beta proteins on oxidatively damaged lipid membranes. *Biochemistry*, 39(32) :10011–10016, August 2000.
  - [143] T. A. Harroun, J. P. Bradshaw, and R. H. Ashley. Inhibitors can arrest the membrane activity of human islet amyloid polypeptide independently of amyloid formation. *FEBS Lett.*, 507(2) :200–204, October 2001.
  - [144] Galyna P. Gorbenko and Paavo K. J. Kinnunen. The role of lipid-protein interactions in amyloid-type protein fibril formation. *Chem. Phys. Lipids*, 141(1-2) :72–82, June 2006.
  - [145] Mihaela Necula, Carmen N. Chirita, and Jeff Kuret. Rapid anionic micelle-mediated alpha-synuclein fibrillization in vitro. *J. Biol. Chem.*, 278(47) :46674–46680, November 2003.
  - [146] Carmen N. Chirita, Mihaela Necula, and Jeff Kuret. Anionic micelles and vesicles induce tau fibrillization in vitro. *J. Biol. Chem.*, 278(28) :25644–25650, July 2003.

- [147] Jefferson D. Knight and Andrew D. Miranker. Phospholipid catalysis of diabetic amyloid assembly. *J. Mol. Biol.*, 341(5) :1175–1187, August 2004.
- [148] Raimon Sabate, Montserrat Gallardo, and Joan Estelrich. Spontaneous incorporation of beta-amyloid peptide into neutral liposomes. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, 270 :13–17, December 2005.
- [149] Irving Langmuir. The constitution and the fundamental properties of solids and liquids.II.Liquids.1. *J. Am. Chem. Soc.*, 39(9) :1848–1906, September 1917.
- [150] A. D. Bangham and R. W. Horne. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agent as observed in the electron microscope. *J. Mol. Biol.*, 8 :660–668, May 1964.
- [151] G. Sessa and G. Weissmann. Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *J. Lipid Res.*, 9(3) :310–318, May 1968.
- [152] M. J. Hope, M. B. Bally, G. Webb, and P. R. Cullis. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure : characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochim. Biophys. Acta*, 812(1) :55–65, January 1985.
- [153] Sophie Pautot, Barbara J. Frisken, and D. A. Weitz. Engineering asymmetric vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100(19) :10718–10721, September 2003.
- [154] Astrid Walrant. *Interactions entre peptides vecteurs et membranes modélisées et biologiques : le cas de trois peptides synthétiques*. Paris 6, January 2011.
- [155] Elena Maltseva and Gerald Brezesinski. Adsorption of Amyloid Beta (1-40) Peptide to Phosphatidylethanolamine Monolayers. *ChemPhysChem*, 5(8) :1185–1190, August 2004.
- [156] Garima Thakur, Miodrag Micic, and Roger M. Leblanc. Surface chemistry of Alzheimer’s disease : a Langmuir monolayer approach. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 74(2) :436–456, December 2009.
- [157] Pravat K. Mandal and Jay W. Pettegrew. Alzheimer’s disease : soluble oligomeric Abeta(1-40) peptide in membrane mimic environment from solution NMR and circular dichroism studies. *Neurochem. Res.*, 29(12) :2267–2272, December 2004.
- [158] A. Choucair, M. Chakrapani, B. Chakravarthy, J. Katsaras, and L. J. Johnston. Preferential accumulation of Abeta(1-42) on gel phase domains of lipid bilayers : an AFM and fluorescence study. *Biochim. Biophys. Acta*, 1768(1) :146–154, January 2007.
- [159] Francis Hane, Elizabeth Drolle, Ravi Gaikwad, Erin Faught, and Zoya Leonenko. Amyloid-beta aggregation on model lipid membranes : an atomic force microscopy study. *J. Alzheimers Dis.*, 26(3) :485–494, 2011.
- [160] Pamela T. Wong, Joseph A. Schauerte, Kathleen C. Wisser, Hao Ding, Edgar L. Lee, Duncan G. Steel, and Ari Gafni. Amyloid-beta membrane binding and permeabilization are distinct processes influenced separately by membrane charge and fluidity. *J. Mol. Biol.*, 386(1) :81–96, February 2009.

- 
- [161] C. Hertel, E. Terzi, N. Hauser, R. Jakob-Rotne, J. Seelig, and J. A. Kemp. Inhibition of the electrostatic interaction between beta-amyloid peptide and membranes prevents beta-amyloid-induced toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94(17) :9412–9416, August 1997.
- [162] J. McLaurin and A. Chakrabartty. Characterization of the interactions of Alzheimer beta-amyloid peptides with phospholipid membranes. *Eur. J. Biochem.*, 245(2) :355–363, April 1997.
- [163] Marc-Antoine Sani, John D. Gehman, and Frances Separovic. Lipid matrix plays a role in Abeta fibril kinetics and morphology. *FEBS Lett.*, 585(5) :749–754, March 2011.
- [164] Keisuke Ikeda and Katsumi Matsuzaki. Driving force of binding of amyloid beta-protein to lipid bilayers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 370(3) :525–529, June 2008.
- [165] Keisuke Ikeda, Takahiro Yamaguchi, Saori Fukunaga, Masaru Hoshino, and Katsumi Matsuzaki. Mechanism of amyloid beta-protein aggregation mediated by GM1 ganglioside clusters. *Biochemistry*, 50(29) :6433–6440, July 2011.
- [166] Kenji Sasahara, Kenichi Morigaki, and Kyoko Shinya. Effects of membrane interaction and aggregation of amyloid beta-peptide on lipid mobility and membrane domain structure. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 15(23) :8929–8939, May 2013.
- [167] Ha Phuong Ta, Karine Berthelot, Benedicte Couлары-Salin, Bernard Desbat, Julie Gean, Laurent Servant, Christophe Cullin, and Sophie Lecomte. Comparative studies of nontoxic and toxic amyloids interacting with membrane models at the air-water interface. *Langmuir*, 27(8) :4797–4807, April 2011.
- [168] D. Blaudez, T. Buffeteau, J. C. Cornut, B. Desbat, N. Escafre, M. Pezolet, and J. M. Turllet. Polarization-Modulated FT-IR Spectroscopy of a Spread Monolayer at the Air/Water Interface. *Applied Spectroscopy*, 47(7) :869–874, July 1993.
- [169] D. Blaudez, T. Buffeteau, J. C. Cornut, B. Desbat, N. Escafre, M. Pezolet, and J. M. Turllet. Polarization modulation FTIR spectroscopy at the air-water interface. *Thin Solid Films*, 242(1-2) :146–150, April 1994.
- [170] Daniel Blaudez, Jean-Marie Turllet, Jean Dufourcq, Delphine Bard, Thierry Buffeteau, and Bernard Desbat. Investigations at the air/water interface using polarization modulation IR spectroscopy. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 92(4) :525–530, January 1996.
- [171] Dianlu Jiang, Kim Lien Dinh, Travis Ruthenburg, Yi Zhang, Lei Su, Donald Land, and Feimeng Zhou. A Kinetic Model for beta-Amyloid Adsorption at the Air/Solution Interface and Its Implication to the beta-Amyloid Aggregation Process. *J Phys Chem B*, 113(10) :3160–3168, March 2009.
- [172] T. M. Allen and L. G. Cleland. Serum-induced leakage of liposome contents. *Biochim. Biophys. Acta*, 597(2) :418–426, April 1980.
- [173] D. A. Kendall and R. C. MacDonald. A fluorescence assay to monitor vesicle fusion and lysis. *J. Biol. Chem.*, 257(23) :13892–13895, December 1982.
- [174] Peter Hortschansky, Volker Schroeckh, Tony Christopeit, Giorgia Zandomenighi, and Marcus Fandrich. The aggregation kinetics of Alzheimer’s beta-amyloid peptide is controlled by stochastic nucleation. *Protein Sci.*, 14(7) :1753–1759, July 2005.



- [175] Tyuji Hoshino, Md Iqbal Mahmood, Kenichi Mori, and Katsumi Matsuzaki. Binding and aggregation mechanism of amyloid beta-peptides onto the GM1 ganglioside-containing lipid membrane. *J Phys Chem B*, 117(27) :8085–8094, July 2013.
- [176] Z. Salamon, H. A. Macleod, and G. Tollin. Coupled plasmon-waveguide resonators : a new spectroscopic tool for probing proteolipid film structure and properties. *Biophys. J.*, 73(5) :2791–2797, November 1997.
- [177] Z. Salamon and G. Tollin. Interaction of horse heart cytochrome c with lipid bilayer membranes : effects on redox potentials. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 29(3) :211–221, June 1997.
- [178] Isabel D. Alves, Scott M. Cowell, Zdzislaw Salamon, Savitha Devanathan, Gordon Tollin, and Victor J. Hruby. Different structural states of the proteolipid membrane are produced by ligand binding to the human delta-opioid receptor as shown by plasmon-waveguide resonance spectroscopy. *Mol. Pharmacol.*, 65(5) :1248–1257, May 2004.
- [179] Ha Phuong Ta, Karine Berthelot, Benedicte Couлары-Salin, Sabine Castano, Bernard Desbat, Pierre Bonnafeous, Olivier Lambert, Isabel Alves, Christophe Cullin, and Sophie Lecomte. A yeast toxic mutant of HET-s amyloid disrupts membrane integrity. *Biochim. Biophys. Acta*, 1818(9) :2325–2334, September 2012.
- [180] Julien Couthouis, Karine Rebora, Francoise Immel, Karine Berthelot, Michel Castroviejo, and Christophe Cullin. Screening for toxic amyloid in yeast exemplifies the role of alternative pathway responsible for cytotoxicity. *PLoS ONE*, 4(3) :e4539, 2009.
- [181] Karine Berthelot, Francoise Immel, Julie Gean, Sophie Lecomte, Reiko Oda, Brice Kauffmann, and Christophe Cullin. Driving amyloid toxicity in a yeast model by structural changes : a molecular approach. *FASEB J.*, 23(7) :2254–2263, July 2009.
- [182] Julien Couthouis, Christelle Marchal, Fabien D'Angelo, Karine Berthelot, and Christophe Cullin. The toxicity of an "artificial" amyloid is related to how it interacts with membranes. *Prion*, 4(4) :283–291, December 2010.
- [183] E. Harte, N. Maalouli, A. Shalabney, E. Texier, K. Berthelot, S. Lecomte, and I. D. Alves. Probing the kinetics of lipid membrane formation and the interaction of a nontoxic and a toxic amyloid with plasmon waveguide resonance. *Chem. Commun. (Camb.)*, 50(32) :4168–4171, April 2014.
- [184] P. S. Vassar and C. F. Culling. Fluorescent stains, with special reference to amyloid and connective tissues. *Arch Pathol*, 68 :487–498, November 1959.
- [185] H. LeVine. Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. *Meth. Enzymol.*, 309 :274–284, 1999.
- [186] Maarten F. M. Engel, Lucie Khemtemourian, Cecile C. Kleijer, Hans J. D. Meeldijk, Jet Jacobs, Arie J. Verkleij, Ben de Kruijff, J. Antoinette Killian, and Jo W. M. Hoppener. Membrane damage by human islet amyloid polypeptide through fibril growth at the membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105(16) :6033–6038, April 2008.

- 
- [187] A. Dazzi, R. Prazeres, F. Glotin, and J. M. Ortega. Local infrared microspectroscopy with subwavelength spatial resolution with an atomic force microscope tip used as a photothermal sensor. *Opt Lett*, 30(18) :2388–2390, September 2005.
  - [188] A. Dazzi, F. Glotin, and R. Carminati. Theory of infrared nanospectroscopy by photothermal induced resonance. *Journal of Applied Physics*, 107(12), 2010.
  - [189] K. Yanagisawa, A. Odaka, N. Suzuki, and Y. Ihara. GM1 ganglioside-bound amyloid beta-protein (A beta) : a possible form of preamyloid in Alzheimer’s disease. *Nat. Med.*, 1(10) :1062–1066, October 1995.
  - [190] Marcus O. W. Grimm, Valerie C. Zimmer, Johannes Lehmann, Heike S. Grimm, and Tobias Hartmann. The impact of cholesterol, DHA, and sphingolipids on Alzheimer’s disease. *Biomed Res Int*, 2013 :814390, 2013.
  - [191] Katsuhiko Yanagisawa. Role of gangliosides in Alzheimer’s disease. *Biochim. Biophys. Acta*, 1768(8) :1943–1951, August 2007.
  - [192] Lucie Caillon, Luminita Duma, Olivier Lequin, and Lucie Khemtémourian. Cholesterol modulates the interaction of the islet amyloid polypeptide with membranes. *Mol. Membr. Biol.*, 31(7-8) :239–249, December 2014.
  - [193] Yanli Mao, Zhiguo Shang, Yosuke Imai, Tyuji Hoshino, Ryugo Tero, Motohiko Tanaka, Naoki Yamamoto, Katsuhiko Yanagisawa, and Tsuneo Urisu. Surface-induced phase separation of a sphingomyelin/cholesterol/ganglioside GM1-planar bilayer on mica surfaces and microdomain molecular conformation that accelerates Abeta oligomerization. *Biochim. Biophys. Acta*, 1798(6) :1090–1099, June 2010.
  - [194] Atsuko Kakio, Sei-ichi Nishimoto, Katsuhiko Yanagisawa, Yasunori Kozutsumi, and Katsumi Matsuzaki. Cholesterol-dependent Formation of GM1 Ganglioside-bound Amyloid beta-Protein, an Endogenous Seed for Alzheimer Amyloid. *J. Biol. Chem.*, 276(27) :24985–24990, June 2001.
  - [195] Iban Amenabar, Simon Poly, Wiwat Nuansing, Elmar H. Hubrich, Alexander A. Govyadinov, Florian Huth, Roman Krutokhvostov, Lianbing Zhang, Mato Knez, Joachim Heberle, Alexander M. Bittner, and Rainer Hillenbrand. Structural analysis and mapping of individual protein complexes by infrared nanospectroscopy. *Nat Commun*, 4, December 2013.
  - [196] F. S. Ruggeri, G. Longo, S. Faggiano, E. Lipiec, A. Pastore, and G. Dietler. Infrared nanospectroscopy characterization of oligomeric and fibrillar aggregates during amyloid formation. *Nat Commun*, 6, July 2015.
  - [197] Sebastian Treusch, Douglas M. Cyr, and Susan Lindquist. Amyloid deposits. *Cell Cycle*, 8(11) :1668–1674, June 2009.
  - [198] Katie J Wolfe and Douglas M Cyr. Amyloid in neurodegenerative diseases : Friend or foe ? *Semin Cell Dev Biol*, 22(5) :476–481, July 2011.
  - [199] Julie S. Valastyan and Susan Lindquist. Mechanisms of protein-folding diseases at a glance. *Dis Model Mech*, 7(1) :9–14, January 2014.

- [200] B. Seilheimer, B. Bohrmann, L. Bondolfi, F. Muller, D. Stuber, and H. Dobeli. The toxicity of the Alzheimer's beta-amyloid peptide correlates with a distinct fiber morphology. *J. Struct. Biol.*, 119(1) :59–71, June 1997.
- [201] Jonathan R. Felts, Kevin Kjoller, Michael Lo, Craig B. Prater, and William P. King. Nanometer-scale infrared spectroscopy of heterogeneous polymer nanostructures fabricated by tip-based nanofabrication. *ACS Nano*, 6(9) :8015–8021, September 2012.
- [202] Aaron M. Katzenmeyer, Glenn Holland, Kevin Kjoller, and Andrea Centrone. Absorption spectroscopy and imaging from the visible through mid-infrared with 20 nm resolution. *Anal. Chem.*, 87(6) :3154–3159, March 2015.
- [203] Emel I. Goksu, Juan M. Vanegas, Craig D. Blanchette, Wan-Chen Lin, and Marjorie L. Longo. AFM for structure and dynamics of biomembranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1788(1) :254–266, January 2009.
- [204] Laura Picas, Pierre-Emmanuel Milhiet, and Jordi Hernandez-Borrell. Atomic force microscopy : a versatile tool to probe the physical and chemical properties of supported membranes at the nanoscale. *Chem. Phys. Lipids*, 165(8) :845–860, December 2012.
- [205] T. Hanai, D. A. Haydon, and Janet Taylor. An Investigation by Electrical Methods of Lecithin-in-Hydrocarbon Films in Aqueous Solutions. *Proceedings of the Royal Society of London A : Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 281(1386) :377–391, September 1964.
- [206] Chunbo Yuan, Jennifer Furlong, Pierre Burgos, and Linda J. Johnston. The size of lipid rafts : an atomic force microscopy study of ganglioside GM1 domains in sphingomyelin/DOPC/cholesterol membranes. *Biophys. J.*, 82(5) :2526–2535, May 2002.
- [207] C. Vigano, L. Manciu, F. Buyse, E. Goormaghtigh, and J. M. Ruyschaert. Attenuated total reflection IR spectroscopy as a tool to investigate the structure, orientation and tertiary structure changes in peptides and membrane proteins. *Biopolymers*, 55(5) :373–380, 2000.
- [208] Ruiqin Liu, Tian Tian, and Jianping Jia. Characterization of the interactions between beta-amyloid peptide and the membranes of human SK-N-SH cells. *FEBS Lett.*, 589(15) :1929–1934, July 2015.
- [209] Fabrizio Chiti and Christopher M. Dobson. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.*, 75 :333–366, 2006.
- [210] P. Hinsmann, J. Frank, P. Svasek, M. Harasek, and B. Lendl. Design, simulation and application of a new micromixing device for time resolved infrared spectroscopy of chemical reactions in solution. *Lab Chip*, 1(1) :16–21, September 2001.
- [211] Matthew B. Kerby, Jinkee Lee, Joshua Ziperstein, and Anubhav Tripathi. Kinetic measurements of protein conformation in a microchip. *Biotechnol. Prog.*, 22(5) :1416–1425, October 2006.
- [212] Patrick Tabeling. *Introduction to Microfluidics*. OUP Oxford, May 2010.
- [213] George M. Whitesides. The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 442(7101) :368–373, July 2006.

- 
- [214] Masaya Kakuta, Peter Hinsmann, Andreas Manz, and Bernhard Lendl. Time-resolved Fourier transform infrared spectrometry using a microfabricated continuous flow mixer : application to protein conformation study using the example of ubiquitin. *Lab Chip*, 3(2) :82–85, May 2003.
- [215] D. C. Duffy, J. C. McDonald, O. J. Schueller, and G. M. Whitesides. Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane). *Anal. Chem.*, 70(23) :4974–4984, December 1998.
- [216] C. S. Effenhauser, G. J. Bruin, A. Paulus, and M. Ehrat. Integrated capillary electrophoresis on flexible silicon microdevices analysis of DNA restriction fragments and detection of single DNA molecules on microchips. *Anal. Chem.*, 69(17) :3451–3457, September 1997.
- [217] E. Prado, A. Colin, L. Servant, and S. Lecomte. SERS spectra of oligonucleotides as fingerprints to detect label-free RNA in microfluidic devices. *Journal of Physical Chemistry C*, 118(25) :13965–13971, 2014.
- [218] Barbara M. Liszka, Hoon Suk Rho, Yoonsun Yang, Aufried T. M. Lenferink, Leon W. M. M. Terstappen, and Cees Otto. A microfluidic chip for high resolution Raman imaging of biological cells. *RSC Adv.*, 5(61) :49350–49355, June 2015.
- [219] N. B. Justis, D.-Y. Zhang, and Y. H. Lo. Integrated dynamic fluidic lens system for in vivo biological imaging. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2 :1256–1259, 2004.
- [220] Xiaoyun Fan, Chunping Jia, Jun Yang, Gang Li, Hongju Mao, Qinghui Jin, and Jianlong Zhao. A microfluidic chip integrated with a high-density PDMS-based microfiltration membrane for rapid isolation and detection of circulating tumor cells. *Biosens Bioelectron*, 71 :380–386, September 2015.
- [221] Sergei G. Kazarian. Enhancing high-throughput technology and microfluidics with FTIR spectroscopic imaging. *Anal Bioanal Chem*, 388(3) :529–532, June 2007.
- [222] Denis Prim, Simon Crelier, and Jean-Manuel Segura. Coupling of a microfluidic mixer to a Fourier-transform infrared spectrometer for protein-conformation studies. *Chimia (Aarau)*, 65(10) :815–816, 2011.
- [223] Ralf Masuch and David A. Moss. Stopped flow apparatus for time-resolved Fourier transform infrared difference spectroscopy of biological macromolecules in H<sub>2</sub>O. *Appl Spectrosc*, 57(11) :1407–1418, November 2003.
- [224] Andrew J. deMello. Control and detection of chemical reactions in microfluidic systems. *Nature*, 442(7101) :394–402, July 2006.
- [225] Evgeny Polshin, Bert Verbruggen, Daan Witters, Bert Sels, Dirk De Vos, Bart Nicolai, and Jeroen Lammertyn. Integration of microfluidics and FT-IR microscopy for label-free study of enzyme kinetics. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 196 :175–182, June 2014.
- [226] Elisa Mitri, Giovanni Birarda, Lisa Vaccari, Sasa Kenig, Massimo Tormen, and Gianluca Greni. SU-8 bonding protocol for the fabrication of microfluidic devices dedicated to FTIR microspectroscopy of live cells. *Lab Chip*, 14(1) :210–218, January 2014.
- [227] Younan Xia and George M. Whitesides. Soft Lithography. *Angewandte Chemie International Edition*, 37(5) :550–575, March 1998.

- [228] Denis Bartolo, Guillaume Degre, Philippe Nghe, and Vincent Studer. Microfluidic stickers. *Lab Chip*, 8(2) :274–279, February 2008.
- [229] Ha Phuong Ta. *Etude de la relation structure - toxicite des proteines amyloides en interaction avec des membranes modeles*. PhD thesis, Bordeaux 1, November 2011.
- [230] Santeri Tuomikoski and Sami Franssila. Free-standing SU-8 microfluidic chips by adhesive bonding and release etching. *Sensors and Actuators A : Physical*, 120(2) :408–415, May 2005.
- [231] Yujun Song, Challa S S R Kumar, and Josef Hormes. Fabrication of an SU-8 based microfluidic reactor on a PEEK substrate sealed by a flexible semi-solid transfer (FST) process. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 14(7) :932–940, July 2004.
- [232] Luis J. Fernandez, Ane Altuna, Maria Tijero, Gemma Gabriel, Rosa Villa, Manuel J. Rodríguez, Montse Batlle, Roman Vilares, Javier Berganzo, and F. J. Blanco. Study of functional viability of SU-8-based microneedles for neural applications. *J. Micromech. Microeng.*, 19(2) :025007, February 2009.
- [233] M. T. Arroyo, L. J. Fernandez, M. Agirregabiria, N. Ibanez1, J. Aurrekoetxea, and F. J. Blanco. Novel all-polymer microfluidic devices monolithically integrated within metallic electrodes for SDS-CGE of proteins. *J. Micromech. Microeng.*, 17(7) :1289, July 2007.
- [234] J. Steigert, O. Brett, C. Muller, M. Strasser, N. Wangler, H. Reinecke, M. Daub, and R. Zengerle. A versatile and flexible low-temperature full-wafer bonding process of monolithic 3d microfluidic structures in SU-8. *J. Micromech. Microeng.*, 18(9) :095013, September 2008.
- [235] Patrick Abgrall, Veronique Conedera, Henri Camon, Anne-Marie Gue, and Nam-Trung Nguyen. SU-8 as a structural material for labs-on-chips and microelectromechanical systems. *ELECTROPHORESIS*, 28(24) :4539–4551, December 2007.
- [236] Patrick Abgrall, Christine Lattes, Véronique Conedera, Xavier Dollat, Stephane Colin, and Anne Marie Gue. A novel fabrication method of flexible and monolithic 3d microfluidic structures using lamination of SU-8 films. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 16(1) :113–121, January 2006.
- [237] Ferdinand Walther, Tanja Drobek, Alexander M. Gigler, Marc Hennemeyer, Michael Kaiser, Helmut Herberg, Tetsuji Shimitsu, Gregor E. Morfill, and Robert W. Stark. Surface hydrophilization of SU-8 by plasma and wet chemical processes. *Surf. Interface Anal.*, 42(12-13) :1735–1744, December 2010.
- [238] Ferdinand Walther, Polina Davydovskaya, Stefan Zurcher, Michael Kaiser, Helmut Herberg, Alexander M Gigler, and Robert W Stark. Stability of the hydrophilic behavior of oxygen plasma activated SU-8. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 17(3) :524–531, March 2007.
- [239] Enoch Kim, Younan Xia, and George M. Whitesides. Polymer microstructures formed by moulding in capillaries. *Nature*, 376(6541) :581–584, August 1995.
- [240] Enoch Kim, Younan Xia, and George M. Whitesides. Micromolding in Capillaries : Applications in Materials Science. *J. Am. Chem. Soc.*, 118(24) :5722–5731, January 1996.

- 
- [241] Philip Wagli, Yu-Chi Chang, Alexandra Homsy, Lubos Hvozدارa, Hans Peter Herzig, and Nico F. de Rooij. Microfluidic Droplet-Based Liquid-Liquid Extraction and On-Chip IR Spectroscopy Detection of Cocaine in Human Saliva. *Analytical Chemistry*, 85(15) :7558–7565, August 2013.
- [242] Jason P. Rolland, Erik C. Hagberg, Ginger M. Denison, Kenneth R. Carter, and Joseph M. De Simone. High-Resolution Soft Lithography : Enabling Materials for Nanotechnologies. *Angewandte Chemie International Edition*, 43(43) :5796–5799, November 2004.
- [243] Ph. Wagli, A. Homsy, and N.F. de Rooij. Norland optical adhesive (NOA81) microchannels with adjustable wetting behavior and high chemical resistance against a range of mid-infrared-transparent organic solvents. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 156(2) :994–1001, August 2011.
- [244] Philip Wagli, Alexandra Homsy, and Nico F. de Rooij. Norland optical adhesive (NOA81) microchannels with adjustable surface properties and high chemical resistance against IR-transparent organic solvents. *Procedia Engineering*, 5 :460–463, 2010.
- [245] Toshio Ando. High-speed atomic force microscopy. *Microscopy (Oxf)*, 62(1) :81–93, February 2013.
- [246] Toshio Ando, Takayuki Uchihashi, and Noriyuki Kodera. High-speed AFM and applications to biomolecular systems. *Annu Rev Biophys*, 42 :393–414, 2013.
- [247] Toshio Ando, Takayuki Uchihashi, and Simon Scheuring. Filming biomolecular processes by high-speed atomic force microscopy. *Chem. Rev.*, 114(6) :3120–3188, March 2014.
- [248] Mikihiro Shibata, Hayato Yamashita, Takayuki Uchihashi, Hideki Kandori, and Toshio Ando. High-speed atomic force microscopy shows dynamic molecular processes in photoactivated bacteriorhodopsin. *Nat Nanotechnol*, 5(3) :208–212, March 2010.
- [249] Noriyuki Kodera, Daisuke Yamamoto, Ryoki Ishikawa, and Toshio Ando. Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy. *Nature*, 468(7320) :72–76, November 2010.
- [250] Takayuki Uchihashi, Ryota Iino, Toshio Ando, and Hiroyuki Noji. High-speed atomic force microscopy reveals rotary catalysis of rotorless F1-ATPase. *Science*, 333(6043) :755–758, August 2011.
- [251] Youichi Shinozaki, Koji Sumitomo, Makoto Tsuda, Schuichi Koizumi, Kazuhide Inoue, and Keiichi Torimitsu. Direct observation of ATP-induced conformational changes in single P2x(4) receptors. *PLoS Biol.*, 7(5) :e1000103, May 2009.
- [252] Mikihiro Shibata, Takayuki Uchihashi, Hayato Yamashita, Hideki Kandori, and Toshio Ando. Structural changes in bacteriorhodopsin in response to alternate illumination observed by high-speed atomic force microscopy. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 50(19) :4410–4413, May 2011.
- [253] Masatoshi Yokokawa and Kunio Takeyasu. Motion of the Ca<sup>2+</sup>-pump captured. *FEBS J.*, 278(17) :3025–3031, September 2011.

- [254] Atsushi Miyagi, Yasuo Tsunaka, Takayuki Uchihashi, Kouta Mayanagi, Susumu Hirose, Kosuke Morikawa, and Toshio Ando. Visualization of intrinsically disordered regions of proteins by high-speed atomic force microscopy. *Chemphyschem*, 9(13) :1859–1866, September 2008.
- [255] Ignacio Casuso, Pierre Sens, Felix Rico, and Simon Scheuring. Experimental evidence for membrane-mediated protein-protein interaction. *Biophys. J.*, 99(7) :L47–49, October 2010.
- [256] Ignacio Casuso, Noriyuki Kodera, Christian Le Grimellec, Toshio Ando, and Simon Scheuring. Contact-mode high-resolution high-speed atomic force microscopy movies of the purple membrane. *Biophys. J.*, 97(5) :1354–1361, September 2009.
- [257] Hayato Yamashita, Kislun VoÅ<sup>-</sup>tchovsky, Takayuki Uchihashi, Sonia Antoranz Contera, John F. Ryan, and Toshio Ando. Dynamics of bacteriorhodopsin 2d crystal observed by high-speed atomic force microscopy. *J. Struct. Biol.*, 167(2) :153–158, August 2009.
- [258] Atsushi Miyagi, Toshio Ando, and Yuri L. Lyubchenko. Dynamics of nucleosomes assessed with time-lapse high-speed atomic force microscopy. *Biochemistry*, 50(37) :7901–7908, September 2011.
- [259] Ignacio Casuso, Jonathan Khao, Mohamed Chami, Perrine Paul-Gilloteaux, Mohamed Husain, Jean-Pierre Duneau, Henning Stahlberg, James N. Sturgis, and Simon Scheuring. Characterization of the motion of membrane proteins using high-speed atomic force microscopy. *Nat Nanotechnol*, 7(8) :525–529, August 2012.
- [260] Hayato Yamashita, Azuma Taoka, Takayuki Uchihashi, Tomoya Asano, Toshio Ando, and Yoshihiro Fukumori. Single-molecule imaging on living bacterial cell surface by high-speed AFM. *J. Mol. Biol.*, 422(2) :300–309, September 2012.
- [261] Daisuke Yamamoto, Takayuki Uchihashi, Noriyuki Kodera, and Toshio Ando. Anisotropic diffusion of point defects in a two-dimensional crystal of streptavidin observed by high-speed atomic force microscopy. *Nanotechnology*, 19(38) :384009, September 2008.
- [262] Humberto Sanchez, Yuki Suzuki, Masatoshi Yokokawa, Kunio Takeyasu, and Claire Wyman. Protein-DNA interactions in high speed AFM : single molecule diffusion analysis of human RAD54. *Integr Biol (Camb)*, 3(11) :1127–1134, November 2011.
- [263] Toshio Ando. High-speed atomic force microscopy coming of age. *Nanotechnology*, 23(6) :062001, February 2012.
- [264] Takayuki Uchihashi, Noriyuki Kodera, and Toshio Ando. Guide to video recording of structure dynamics and dynamic processes of proteins by high-speed atomic force microscopy. *Nat Protoc*, 7(6) :1193–1206, June 2012.
- [265] Kiyohiko Igarashi, Anu Koivula, Masahisa Wada, Satoshi Kimura, Merja PenttilÄ, and Masahiro Samejima. High speed atomic force microscopy visualizes processive movement of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I on crystalline cellulose. *J. Biol. Chem.*, 284(52) :36186–36190, December 2009.
- [266] Jamie L. Gilmore, Yuki Suzuki, Gintautas Tamulaitis, Virginijus Siksnys, Kunio Takeyasu, and Yuri L. Lyubchenko. Single-molecule dynamics of the DNA-EcoRII protein complexes

- revealed with high-speed atomic force microscopy. *Biochemistry*, 48(44) :10492–10498, November 2009.
- [267] Yuki Suzuki, Jamie L. Gilmore, Shige H. Yoshimura, Robert M. Henderson, Yuri L. Lyubchenko, and Kunio Takeyasu. Visual analysis of concerted cleavage by type IIF restriction enzyme SfiI in subsecond time region. *Biophys. J.*, 101(12) :2992–2998, December 2011.
- [268] Pierre-Emmanuel Milhiet, Daisuke Yamamoto, Olivia Berthoumieu, Patrice Dosset, Christian Le Grimellec, Jean-Michel Verdier, Stephane Marchal, and Toshio Ando. Deciphering the structure, growth and assembly of amyloid-like fibrils using high-speed atomic force microscopy. *PLoS ONE*, 5(10) :e13240, 2010.
- [269] Marie-Cecile Giocondi, Daisuke Yamamoto, Eric Lesniewska, Pierre-Emmanuel Milhiet, Toshio Ando, and Christian Le Grimellec. Surface topography of membrane domains. *Biochim. Biophys. Acta*, 1798(4) :703–718, April 2010.
- [270] Sarah Henry, Helene Vignaud, Claude Bobo, Marion Decossas, Oliver Lambert, Etienne Harte, Isabel D. Alves, Christophe Cullin, and Sophie Lecomte. Interaction of A-beta(1-42) Amyloids with Lipids Promotes "Off-Pathway" Oligomerization and Membrane Damage. *Biomacromolecules*, 16(3) :944–950, March 2015.
- [271] Karine Berthelot, Sophie Lecomte, Julie Gean, Françoise Immel, and Christophe Cullin. A Yeast Toxic Mutant of HET-s(218-289) Prion Displays Alternative Intermediates of Amyloidogenesis. *Biophys J*, 99(4) :1239–1246, August 2010.
- [272] Erik C. Yusko, Panchika Prangkio, David Sept, Ryan C. Rollings, Jiali Li, and Michael Mayer. Single Particle Characterization of A-beta Oligomers in Solution. *ACS Nano*, 6(7) :5909–5919, July 2012.
- [273] Yu-Jen Chang and Yun-Ru Chen. The coexistence of an equal amount of Alzheimer's amyloid-beta 40 and 42 forms structurally stable and toxic oligomers through a distinct pathway. *FEBS J.*, 281(11) :2674–2687, June 2014.
- [274] Frank Ferrone. [17] Analysis of protein aggregation kinetics. In Ronald Wetzel, editor, *Methods in Enzymology*, volume 309 of *Amyloid, Prions, and Other Protein Aggregates*, pages 256–274. Academic Press, 1999.
- [275] Songming Chen, Frank A. Ferrone, and Ronald Wetzel. Huntington's disease age-of-onset linked to polyglutamine aggregation nucleation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(18) :11884–11889, September 2002.
- [276] Samuel I. A. Cohen, Michele Vendruscolo, Mark E. Welland, Christopher M. Dobson, Eugene M. Terentjev, and Thomas P. J. Knowles. Nucleated polymerization with secondary pathways. I. Time evolution of the principal moments. *The Journal of Chemical Physics*, 135(6) :065105, August 2011.
- [277] Jesper Ferkinghoff-Borg, Jesper Fonslet, Christian Beyschau Andersen, Sandeep Krishna, Simone Pigolotti, Hisashi Yagi, Yuji Goto, Daniel Otzen, and Mogens H. Jensen. Stop-and-go kinetics in amyloid fibrillation. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 82(1 Pt 1) :010901, July 2010.



- [278] Miklos S. Z. Kellermayer, Arpad Karsai, Margit Benke, Katalin Soos, and Botond Penke. Stepwise dynamics of epitaxially growing single amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(1) :141–144, January 2008.
- [279] Wei Qiang, Kevin Kelley, and Robert Tycko. Polymorph-specific kinetics and thermodynamics of beta-amyloid fibril growth. *J. Am. Chem. Soc.*, 135(18) :6860–6871, May 2013.
- [280] Alexander K. Buell, Christopher M. Dobson, and Tuomas P. J. Knowles. The physical chemistry of the amyloid phenomenon : thermodynamics and kinetics of filamentous protein aggregation. *Essays Biochem.*, 56 :11–39, 2014.
- [281] Tuomas P. J. Knowles, Christopher A. Waudby, Glyn L. Devlin, Samuel I. A. Cohen, Adriano Aguzzi, Michele Vendruscolo, Eugene M. Terentjev, Mark E. Welland, and Christopher M. Dobson. An analytical solution to the kinetics of breakable filament assembly. *Science*, 326(5959) :1533–1537, December 2009.
- [282] Tadato Ban, Masaru Hoshino, Satoshi Takahashi, Daizo Hamada, Kazuhiro Hasegawa, Hironobu Naiki, and Yuji Goto. Direct Observation of A-beta Amyloid Fibril Growth and Inhibition. *Journal of Molecular Biology*, 344(3) :757–767, November 2004.
- [283] Simon D. Connell and D. Alastair Smith. The atomic force microscope as a tool for studying phase separation in lipid membranes (Review). *Molecular Membrane Biology*, 23(1) :17–28, January 2006.
- [284] Arun Radhakrishnan. Phase separations in binary and ternary cholesterol-phospholipid mixtures. *Biophys. J.*, 98(9) :L41–43, May 2010.
- [285] Gerald W. Feigenson. Phase diagrams and lipid domains in multicomponent lipid bilayer mixtures. *Biochim Biophys Acta*, 1788(1) :47–52, January 2009.
- [286] Sarah L. Veatch and Sarah L. Keller. Separation of Liquid Phases in Giant Vesicles of Ternary Mixtures of Phospholipids and Cholesterol. *Biophys J*, 85(5) :3074–3083, November 2003.
- [287] Manuela Menke, Stephanie Kunneke, and Andreas Janshoff. Lateral organization of GM1 in phase-separated monolayers visualized by scanning force microscopy. *Eur. Biophys. J.*, 31(4) :317–322, July 2002.
- [288] Nicolas Puff, Chiho Watanabe, Michel Seigneuret, Miglena I. Angelova, and Galya Staneva. Lo/Ld phase coexistence modulation induced by GM1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1838(8) :2105–2114, August 2014.
- [289] Bodil Westerlund and J. Peter Slotte. How the molecular features of glycosphingolipids affect domain formation in fluid membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1788(1) :194–201, January 2009.
- [290] C. Dietrich, L. A. Bagatolli, Z. N. Volovyk, N. L. Thompson, M. Levi, K. Jacobson, and E. Gratton. Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophys. J.*, 80(3) :1417–1428, March 2001.
- [291] Ren Bao, Li Li, Feng Qiu, and Yuliang Yang. Atomic force microscopy study of ganglioside GM1 concentration effect on lateral phase separation of sphingomye-

- lin/dioleoylphosphatidylcholine/cholesterol bilayers. *J Phys Chem B*, 115(19) :5923–5929, May 2011.
- [292] Katsumi Matsuzaki. How Do Membranes Initiate Alzheimer’s Disease ? Formation of Toxic Amyloid Fibrils by the Amyloid beta-Protein on Ganglioside Clusters. *Acc. Chem. Res.*, 47(8) :2397–2404, August 2014.
- [293] Katsumi Matsuzaki and Chiho Horikiri. Interactions of Amyloid beta-Peptide (1-40) with Ganglioside-Containing Membranes. *Biochemistry*, 38(13) :4137–4142, March 1999.
- [294] Maria Carmela Nicastro, Dario Spigolon, Fabio Librizzi, Oscar Moran, Maria Grazia Ortore, Donatella Bulone, Pier Luigi San Biagio, and Rita Carrotta. Amyloid beta-peptide insertion in liposomes containing GM1-cholesterol domains. *Biophys. Chem.*, July 2015.
- [295] Jacques Fantini and Nouara Yahi. Molecular insights into amyloid regulation by membrane cholesterol and sphingolipids : common mechanisms in neurodegenerative diseases. *Expert Rev Mol Med*, 12, September 2010.
- [296] Silvia Seghezza, Alberto Diaspro, Claudio Canale, and Silvia Dante. Cholesterol drives Abeta(1-42) interaction with lipid rafts in model membranes. *Langmuir*, 30(46) :13934–13941, November 2014.
- [297] Moutusi Manna and Chaitali Mukhopadhyay. Binding, Conformational Transition and Dimerization of Amyloid-beta Peptide on GM1-Containing Ternary Membrane : Insights from Molecular Dynamics Simulation. *PLoS One*, 8(8), August 2013.
- [298] Coralie Di Scala, Henri Chahinian, Nouara Yahi, Nicolas Garmy, and Jacques Fantini. Interaction of Alzheimer’s beta-amyloid peptides with cholesterol : mechanistic insights into amyloid pore formation. *Biochemistry*, 53(28) :4489–4502, July 2014.
- [299] Savitha Devanathan, Zdzislaw Salamon, Goran Lindblom, Gerhard Grobner, and Gordon Tollin. Effects of sphingomyelin, cholesterol and zinc ions on the binding, insertion and aggregation of the amyloid Abeta(1-40) peptide in solid-supported lipid bilayers. *FEBS J.*, 273(7) :1389–1402, April 2006.
- [300] Naoki Yamamoto, Etsuro Matsubara, Sumihiro Maeda, Hirohisa Minagawa, Akihiko Takashima, Wakako Maruyama, Makoto Michikawa, and Katsuhiko Yanagisawa. A ganglioside-induced toxic soluble Abeta assembly. Its enhanced formation from Abeta bearing the Arctic mutation. *J. Biol. Chem.*, 282(4) :2646–2655, January 2007.
- [301] Martino Calamai and Francesco S. Pavone. Partitioning and confinement of GM1 ganglioside induced by amyloid aggregates. *FEBS Lett.*, 587(9) :1385–1391, May 2013.
- [302] F. William Studier. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.*, 41(1) :207–234, May 2005.
- [303] G. Rouser, S. Fkeischer, and A. Yamamoto. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids*, 5(5) :494–496, May 1970.
- [304] P.C.S. Hayfield. Ellipsometry as an aid in studying metallic corrosion problems. *Surface Science*, 56(C) :488–507, 1976.

- [305] Elio Passaglia, Robert R. Stromberg, and Jerome Kruger. *Ellipsometry in the Measurement of Surfaces and Thin Films : Symposium Proceedings*. U.S. National Bureau of Standards, 1964.
- [306] T. Buffeteau, B. Desbat, and J. M. Turelet. Polarization Modulation FT-IR Spectroscopy of Surfaces and Ultra-thin Films : Experimental Procedure and Quantitative Analysis. *Applied Spectroscopy*, 45(3) :380–389, March 1991.
- [307] Richard Mendelsohn, Guangru Mao, and Carol R. Flach. Infrared Reflection-Absorption Spectroscopy : Principles and Applications to Lipid-Protein Interaction in Langmuir Films. *Biochim Biophys Acta*, 1798(4) :788–800, April 2010.
- [308] A. Dazzi, S. Goumri-Said, and L. Salomon. Theoretical study of an absorbing sample in infrared near-field spectromicroscopy. *Optics Communications*, 235(4-6) :351–360, May 2004.
- [309] Alexandre Dazzi, Craig B. Prater, Qichi Hu, D. Bruce Chase, John F. Rabolt, and Curtis Marcott. AFM-IR : combining atomic force microscopy and infrared spectroscopy for nanoscale chemical characterization. *Appl Spectrosc*, 66(12) :1365–1384, December 2012.

# Interaction of $A\beta_{1-42}$ Amyloids with Lipids Promotes “Off-Pathway” Oligomerization and Membrane Damage

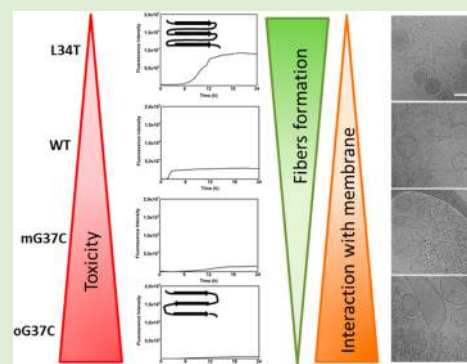
Sarah Henry,<sup>†</sup> H     Vignaud,<sup>‡</sup> Claude Bobo,<sup>‡</sup> Marion Decossas,<sup>†</sup> Oliver Lambert,<sup>†</sup> Etienne Harte,<sup>†</sup> Isabel D. Alves,<sup>†</sup> Christophe Cullin,<sup>‡</sup> and Sophie Lecomte<sup>\*,†</sup>

<sup>†</sup>Chimie et Biologie des Membranes et Nanoobjets, CBMN CNRS UMR 5248, Université de Bordeaux, Allée Geoffroy de Saint Hilaire, 33600 Pessac, France

<sup>‡</sup>Institut de Biochimie et Génétique Cellulaire, IBGC CNRS UMR 5095, Université de Bordeaux, 1 rue Camille Saint Sa  ns, 33077 Bordeaux cedex, France

## S Supporting Information

**ABSTRACT:** The toxicity of amyloids, as  $A\beta_{1-42}$  involved in Alzheimer disease, is a subject under intense scrutiny. Many studies link their toxicity to the existence of various intermediate structures prior to fiber formation and/or their specific interaction with membranes. In this study we focused on the interaction between membrane models and  $A\beta_{1-42}$  peptides and variants (L34T, mG37C) produced in *E. coli* and purified in monomeric form. We evaluated the interaction of a toxic stable oligomeric form (oG37C) with membranes as comparison. Using various biophysical techniques as fluorescence and plasmon waveguide resonance, we clearly established that the oG37C interacts strongly with membranes leading to its disruption. All the studied peptides destabilized liposomes and accumulated slowly on the membrane (rate constant  $0.02 \text{ min}^{-1}$ ). Only the oG37C exhibited a particular pattern of interaction, comprising two steps: the initial binding followed by membrane reorganization. Cryo-TEM was used to visualize the peptide effect on liposome morphologies. Both oG37C and mG37C lead to PG membrane fragmentation. The PG membrane promotes peptide oligomerization, implicated in membrane disruption. WT ( $A\beta_{1-42}$ ) also perturbs liposome organization with membrane deformation rather than disruption. For all the peptides studied, their interaction with the membranes changes their fibrillization process, with less fibers and more small aggregates being formed. These studies allowed to establish, a correlation between toxicity, fiber formation, and membrane disruption.



## INTRODUCTION

In humans, amyloid formation is often associated with diseases commonly referred to as protein misfolding diseases, aggregation diseases, proteopathies, or, more specifically, amyloid diseases or amyloidoses. Amyloid structure is also associated with an unusual class of transmissible pathogenic agent known as prion and found in transmissible spongiform encephalopathies. Interestingly, in most of these pathologies, mutations in genes encoding the amyloid proteins can increase the propensity to develop the disease. The accumulation of peptides into long fibrils is a hallmark of the disease and for a long time led to the hypothesis that these deposits would be toxic by themselves. In Alzheimer’s disease, it is now widely admitted that  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) deposits are not directly correlated with the pathology whereas the presence of soluble  $A\beta$  species appears to be related with the severity of the dementia.<sup>1</sup> In vitro, the toxicity of amyloid proteins depends on their aggregation level. When added to cells in culture, monomeric species or long fibril species do not affect cellular viability whereas oligomeric species lead to its decrease.<sup>2,3</sup> Toxicity of various soluble oligomers may be inhibited by specific structural antibodies, which means that toxic oligomers may share a common structure.<sup>2</sup> The physicochemical

properties of toxic oligomeric species are not well understood and may also depend on their primary sequences. The formation process of this intermediate is still under debate. Some authors claim that intermediates are formed in the fibrillization process (on pathway),<sup>4</sup> and others suggest that it is independent of the fibrillization process (off pathway).<sup>5,6</sup>

Despite intensive research in the field, such intermediates are not yet fully characterized, probably because of the lack of adapted methods for their analyses. Considerable discrepancies in the reported results arise from the source of  $A\beta$  and their aggregation state.<sup>7</sup> Synthetic peptides are often used as substrates for the different studies. Although powerful and easy to handle, their use may be problematic due to their notorious propensity to self-assembly. Solubilization and monomerization of the lyophilized product is often matter of concern. The sample heterogeneity contributes to a lack of reproducibility. We use an alternative procedure, described previously,<sup>5,8</sup> to produce highly pure  $A\beta_{1-42}$  leading to reproducible kinetic assemblies. We carry out genetic screening

Received: December 18, 2014

Revised: February 16, 2015

Published: February 17, 2015

in yeast to isolate mutants generated by random mutagenesis of the  $A\beta_{1-42}$  amyloid protein, which reveal different toxicities in yeast ranging from harmless to very damaging.<sup>5</sup> Interestingly, a single mutation, as replacing a G residue in position 37 by a C residue, generates a huge increase in toxicity comparing with WT. On the contrary, a single mutation from L to T residue in position 34 decreases toxicity. During the purification of G37C, two forms are identified, monomer and oligomer, leading to two different fibrillization pathways.<sup>5</sup> In solution, the monomer G37C (mG37C) is able to form long fibers with a characteristic parallel  $\beta$ -sheet organization, as the WT with an “on pathway” self-assembling process.<sup>5</sup> The oligomer G37C (oG37C) is stable in solution, comes from an “off pathway” self-assembly process, does not form long fibers, and is organized in antiparallel  $\beta$ -sheet, as detailed in our previous paper.<sup>5</sup> It has been recently proposed that the toxicity could lie on the existence of oligomer states organized in antiparallel  $\beta$ -sheet.<sup>9–12</sup>

It has also been proposed that these species would be toxic by their capacity to interact and disrupt biological membranes. It is now widely accepted that amyloidogenesis itself is also influenced by membranes. Indeed, membranes can catalyze amyloidogenesis and their lipid composition and charge may be of particular importance, as for example the presence of cholesterol and gangliosides. It is well-known that  $A\beta$  membrane binding is enhanced by anionic lipids. Lipids promoting negative membrane curvature have also been proposed to favor membrane disruption by amyloid peptide, as observed for hIAPP.<sup>13,14</sup> Several reviews describe the different possible mechanisms for the interaction between the toxic amyloids and membranes.<sup>15–17</sup> All the proposed mechanisms are similar to those described for antimicrobial agents, as detergent effect, carpet effect, or pore formation. The most characterized mechanism, identified for several amyloids, such as  $\alpha$ -synuclein, IAPP, and  $A\beta$ ,<sup>18</sup> is the membrane permeabilization resulting from oligomeric pore structures. In this case, the permeabilization was mainly detected by ion channel conductivity and the pore formation was visualized by atomic force microscopy (AFM) or electron microscopy (TEM). Some authors demonstrated that after pore formation by  $A\beta$  peptides, a second mechanism takes place leading to membrane fragmentation.<sup>19</sup> Then, toxicity of amyloids is linked to the existence of various intermediate structures, prior to the fiber formation and their interaction with membranes.

In this study we investigated the interaction of the different  $A\beta_{1-42}$  variants with lipid membrane models as LUVs (large unilamellar vesicles) or supported bilayers. The composition of membrane in live cells is exceedingly complex, we used simple membrane model systems composed of pure 1, 2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(10-*rac*-glycerol) (DOPG) or 1, 2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC) to evaluate the influence of the lipid headgroup charge on protein–lipid interaction and on peptide self-assembling process. PC (zwitterionic head-group) is known to be the main lipid present in the membrane of eukaryotic cells. PG was chosen as negatively charged lipids, but also for its surface OH group, that can be viewed as a simplistic GM1 model, to highlight the importance of electrostatic interaction and H bonding ability. The combination of different spectroscopic methods as fluorescence (calcein leakage and ThT binding) and plasmon waveguide resonance spectroscopy (PWR) allowed us to evaluate the effects of the peptides ( $A\beta_{1-42}$ , L34T, mG37C, and oG37C) on membranes in terms of accumulation, interaction kinetics and perturbation

of membrane integrity. Cryo-TEM images allowed direct visualization of membrane damages. All the peptides interact poorly with pure PC, but strongly with PG membrane, even if the peptide is negatively charged. The OH group of PG could establish hydrogen bonding with peptide promoting binding. The peptide fibrillization process was modified by this lipid interaction resulting in more aggregates (small oligomer assembly) and less fibers. We neatly show that the oligomer G37C (characterized as highly toxic previously<sup>5</sup>) disrupts the integrity of the DOPG membrane, contrarily to the other peptides (less toxic). The interaction of oG37C with the membrane reduced the fibrillization process; thus, the higher the toxicity and membrane perturbation effect, the lower the capacity to form fibers.

## MATERIALS AND METHODS

**Materials.** 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(10-*rac*-glycerol) (DOPG) and 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC) were purchased from Avanti Polar Lipids, Inc. Both lipids are fluid at room temperature. Calcein was obtained from Sigma. Ultrapure water with a nominal resistivity of 18 m $\Omega$ -cm (Milli-Q Millipore) was used for all buffers.

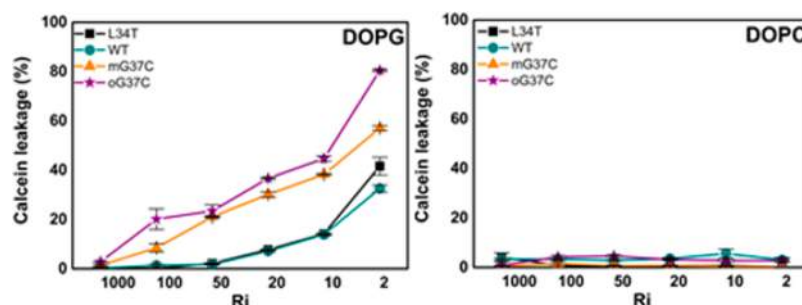
**Peptide Purification.**  $A\beta_{1-42}$  wild type and single variants (L34T and G37C) were selected in yeast, produced, and purified as previously described elsewhere.<sup>20,5</sup> Purity of the peptides was followed by size exclusion chromatography and by mass spectrometry.<sup>5</sup> After purification, the monomers of  $A\beta_{1-42}$  (WT), L34T, and mG37C as the oG37C were pooled separately, frozen in liquid nitrogen, and conserved at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use.

**Liposome Preparation.** A solution of lipids in chloroform/methanol (4:1 vol/vol) was evaporated under nitrogen flow and left under vacuum for 3–4 h to remove all organic solvent traces. The lipid film formed was hydrated with buffer (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, DTT 5 mM, pH 7.4) and vortexed. Rehydrated lipid suspensions were subjected to five hot/cold cycles from liquid nitrogen to a  $40^{\circ}\text{C}$  water bath. LUVs were then extruded 11 times with a mini-extruder using membranes with pore diameter of 100 nm. The lipid concentration was calculated by phosphate quantification.<sup>21</sup> DLS (DynaPro Nanostar, U.S.) shows a single population of LUVs with a size around 120 nm.

**Calcein Leakage Assay.** Calcein-containing LUVs were prepared with the same protocol used to make regular LUVs except for the hydration step where Tris buffer included 70 mM calcein. Size exclusion column chromatography (Sephadex G-75) was used to separate free calcein from LUVs containing calcein. Fluorescence measurements were made with a POLAR star Omega microplate reader (BMG Labtech, Champigny-sur-Marne, France). After the addition of the reactants the 96-well microplate was shaken just before measurement. Data were collected every 120 s at  $25^{\circ}\text{C}$ ,  $\lambda_{\text{excitation}}$  at 485 nm and  $\lambda_{\text{emission}}$  at 520 nm. Lipid concentration was set at 10  $\mu\text{M}$  and concentration of peptide varied from 0.01 to 5  $\mu\text{M}$  (total volume 200  $\mu\text{L}$ ). After 4 h, 1  $\mu\text{L}$  of 10% Triton X-100 (Sigma) solution was added to achieve complete liposome leakage. The percentage of calcein release was calculated according to the following equation:  $L(t) = [(F_t - F_0)/(F_{\text{max}} - F_0)] \times 100$ , where  $L(t)$  is the percentage of the calcein released (%),  $F_t$  is the measured fluorescence intensity at time  $t$ ,  $F_0$  is the fluorescence intensity at time  $t = 0$  and  $F_{\text{max}}$  is the fluorescence intensity after addition of Triton X-100.

**Plasmon-Waveguide Resonance Spectroscopy.** PWR spectra are produced by resonant excitation of conduction electron oscillation (plasmons) by light from a polarized CW laser (He–Ne; wavelength of 632.8 and 543.5 nm) incident on the back surface of a thin metal film (Ag) deposited on a glass prism and coated with a layer of  $\text{SiO}_2$ .<sup>22</sup> Experiments were performed on a homemade PWR instrument, described previously.<sup>23</sup> Resonances were obtained using an incident light combining simultaneously both parallel (*s*-polarization) and perpendicular (*p*-polarization) polarizations allowing two contributions in PWR spectra where normalized reflected light intensity is





**Figure 1.** Maximum leakage of DOPG (Left) or DOPC (right) LUVs (10  $\mu\text{M}$ ) by L34T (black square), WT (cyan circle), oG37C (purple star), and mG37C (orange triangle). Peptide was added to lipid vesicles in various lipid to peptide ratio ( $R_i$ ). Results are the average of three independent measures, and error bars represent the standard deviation.

plotted as a function of the incident angle. The lipid bilayer is formed injecting around 2  $\mu\text{L}$  of the lipid solution (10 mg/mL in butanol/squalene 0.95/0.05 v/v) into the orifice of a Teflon block that is in contact with the silica layer of the prism. The bilayer is spontaneously formed after filling the Teflon tank with Tris buffer and rinsed several times in order to remove lipid excess. The molecules (such as lipids and peptides) deposited onto or in close proximity of the surface plasmon resonator change the resonance characteristics of the plasmon formation and can thereby be detected and characterized. Plasmons act as a probe only sensitive to the optical properties of material that is deposited on or close to the resonator surface; there is no interference from the material in bulk solution. Spectra were acquired and compared to the spectra obtained with buffer in order to ensure that a bilayer was formed (angular shift of  $p$ -polarization > angular shift of  $s$ -polarization). Peptides were injected at fixed concentration (5  $\mu\text{M}$ ) and the spectral evolution followed in time. The amount of peptide bound to lipid bilayer is associated with the resonance shift observed. At the end of the experiment, the PWR cell is rinsed to remove unbound material. Fits of experimental spectra were performed with Winspall software,<sup>24</sup> it is based on the Fresnel equations and the matrix formalism. The details are reported in our previous paper.<sup>23</sup>

**ThT Fluorescence Assay.**  $A\beta$  peptides (20  $\mu\text{M}$ ) were incubated with various concentrations of DOPG LUVs from 0.04 to 2 mM and with 20  $\mu\text{M}$  of Thioflavine T dye (total volume 200  $\mu\text{L}$ ) for 24 h. Fluorescence measurements were made with a POLARstar Omega microplate reader (BMG Labtech, Champigny-sur-Marne, France). After the addition of the reactants, the 96-well microplate was shaken just before measurement during 10 s. Data were collected as the average of 10 flashes every 6 min at 30  $^{\circ}\text{C}$ ,  $\lambda_{\text{excitation}}$  at 440 nm and  $\lambda_{\text{emission}}$  at 480 nm. Results are the average of three independent measurements.

**Cryo-Transmission Electron Microscopy (Cryo-TEM).** Peptides (10  $\mu\text{M}$ ) were incubated with 20  $\mu\text{M}$  of DOPG LUVs in Tris buffer. Samples were observed at different times: 2 and 24 h, corresponding to different aggregation states. A 5  $\mu\text{L}$  aliquot was deposited onto a lacey carbon copper grid (Ted Pella). After removing the excess of solution with filter paper, the grid was rapidly plunged into a liquid ethane bath cooled with liquid nitrogen using EM CPC (Leica). Specimens were maintained at a temperature of approximately  $-170^{\circ}\text{C}$ , using a cryo holder (Gatan, U.S.A.), and observed under low-dose conditions with a FEI Tecnai F20 electron microscope operating at 200 kV.

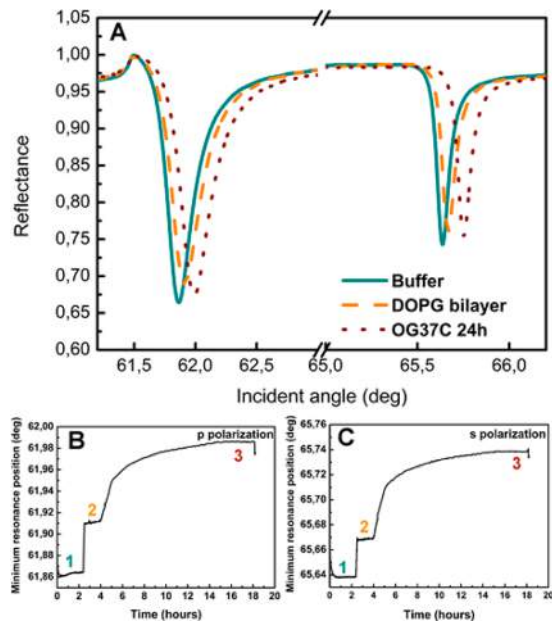
## RESULTS AND DISCUSSION

**$A\beta$  Variants Permeabilize DOPG Membranes.** The effect of the different peptides (WT, L34T, mG37C, and oG37C) on membrane integrity was assayed by measuring calcein leakage from DOPC and DOPG LUVs. Increasing peptide concentrations were added to LUVs of DOPC or DOPG (at 10  $\mu\text{M}$ ) encapsulating calcein to obtain lipid/peptide ratios ( $R_i$ ) from 2 to 1000. The membrane permeabilization kinetics was followed. Strong leakage of

DOPG LUVs was induced by all peptides (Figure 1). No lag phase, neither fluorescence starting point can be observed since LUVs leakage was instantaneous. After 30 min a plateau was reached for all peptides. oG37C caused leakage of 80% of DOPG LUVs for a concentration of 5  $\mu\text{M}$  ( $R_i = 2$ ). At similar  $R_i$  values the WT, L34T, and mG37C showed around, 30, 40, and 60% of DOPG LUV leakage, respectively (Figure 1). WT and L34T have similar behavior on DOPG membrane. The more toxic peptide G37C induces larger perturbations whatever the injected forms (monomer mG37C or oligomer oG37C).

With DOPC, small leakage was observed (less than 3%), whatever the peptides used (Figure 1). This probably results from the poor affinity of  $A\beta$  peptides for zwitterionic membranes. Indeed a poor interaction is found between zwitterionic lipids as phosphatidylcholine and soluble  $A\beta$ , while  $A\beta_{1-42}$  was found to strongly interact with negatively charged lipids.<sup>25,26</sup> The net charge of the  $A\beta_{1-42}$  is  $-2.8$  at the physiological pH.<sup>27</sup> The interaction driving force does not seem to be electrostatic, due to the poor interaction with the PC. The strong interaction with anionic lipids (PG) could be explained by hydrogen bonding between the peptide side chains and OH groups in PG. Indeed, several authors established a specific interaction between  $A\beta_{1-40}$  and ganglioside (GM1) clusters present in lipid raft microdomains.<sup>19,28,29</sup> Hydrogen bonding as well as hydrophobic interactions with sugar group of glycolipids drive the membrane binding of  $A\beta_{1-40}$ .<sup>28,30</sup> The gangliosides contain several OH groups as the PG lipid headgroup. When comparing the variants, L34T behaves as WT, G37C induces more dye release than the WT. Significant permeabilization of DOPG LUVs starts at lower peptide concentration for G37C (0.1  $\mu\text{M}$ ) than for WT (1  $\mu\text{M}$ ). This difference may either be due to a better affinity of the mutant for the membrane or to its higher propensity to reorganize the lipid bilayer. To further investigate this point, we used a complementary approach based on PWR.

**Oligomer  $A\beta$  Accumulates Differently than Monomer  $A\beta$  on DOPG Membranes.** PWR experiments were performed to follow lipid interaction and determine the effect of peptides in the organization of DOPG and DOPC supported bilayers. The positive shifts of the resonance minimum position observed in  $p$ -polarization and  $s$ -polarization after deposition of the lipids were characteristic of a well-organized lipid bilayer.<sup>31,32,23</sup> Then, proteins were added at fixed concentrations (5  $\mu\text{M}$ ) to the PWR cell, and the minimum resonance position shift was monitored for 24 h. Figure 2A shows PWR spectra corresponding to buffer, DOPG bilayer formation and after addition of peptide. When following the resonance minimum position with time (Figure 2B,C), the first plateau

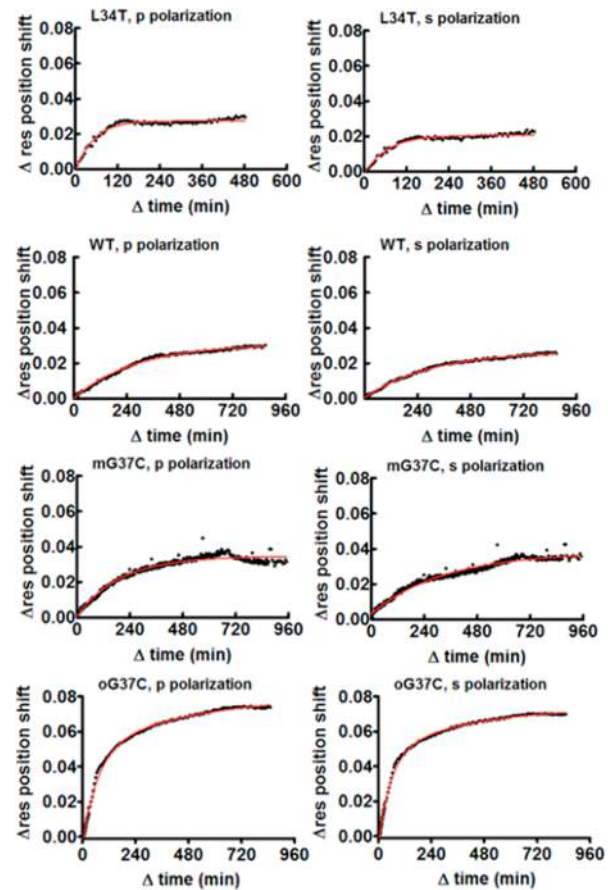


**Figure 2.** Interaction of oG37c with DOPG bilayer. PWR spectra (A) and corresponding changes in resonance minimum position as a function of time measured with (B) *p*- and (C) *s*-polarizations obtained before (1) and after (2) DOPG bilayer formation and (3) upon addition of peptide (oG37C at 5  $\mu$ M).

(1) corresponds to the equilibrium resonance position of the buffer. At around 2 h, (2) the large angular shift observed corresponds to the lipid bilayer formation. At 5 h, the peptide was injected and the change in resonance minimum position was followed (3). After rinsing the cell, no change in the resonance minimum position was observed. The positive spectral shifts for both polarizations observed after peptide addition indicate that there was an overall increase in the refractive index, which is a direct consequence of the mass augmentation due to peptide deposition on the lipid membrane. Table 1 lists the magnitude of the shifts obtained upon addition of each peptide to the membrane for both polarizations. The spectral shifts induced by the addition of peptides were equivalent in *p*- and *s*-polarization meaning that the interaction between the peptides and the membrane is isotropic with no preferred orientation of the peptides on the membrane. All the monomeric injected peptides (mG37C, WT, L34T) exhibited a smaller shift than oG37C on DOPG bilayers, (77.5 mdeg vs 28 mdeg for WT, values corresponding to the averaged angle shifts obtained in *p*- and *s*-polarizations; Table 1). The increase in membrane thickness was evaluated at +1.5 nm for the peptides injected as monomer (WT, L34T, and mG37C) and at 5 nm for the peptide injected as oligomer (oG37C).

The PWR technique can provide affinity constants between molecules. The difficulty here comes from the fact that the measurement does not only reflect the interaction but also the

lipid and peptide reorganization. In the case of amyloid peptides, there is coexistence of peptide self-assembly concomitantly with their lipid interaction. Therefore, it was not possible to accurately determine affinity constants.<sup>33</sup> Nevertheless, accumulation rate constants were determined by fitting kinetic curves (see Figure 3) and are presented in



**Figure 3.** Kinetics of amyloid peptide interaction with DOPG lipid membranes obtained by PWR. Variation of the minimum resonance position obtained with perpendicular *p*- (left) and parallel (right) *s*-polarization is plotted as a function of time. Red curves correspond to fitting of the kinetic data (black spots) obtained right after peptide injection and until equilibrium is reached from peptide injection.

Table 2. So far no information regarding kinetic rates for the interaction of  $A\beta_{1-42}$  peptide with membranes has been reported in the literature. For all peptides injected in monomeric form (WT, L34T, mG37C) the kinetic data can be fitted by one phase exponential equation ( $k_1$  in  $\text{min}^{-1}$ ), corresponding to the anchorage of the peptide on the membrane. For oG37C, the results are different; the best fit was obtained using a two phase exponential equation. We propose that a first step could correspond to the anchorage of

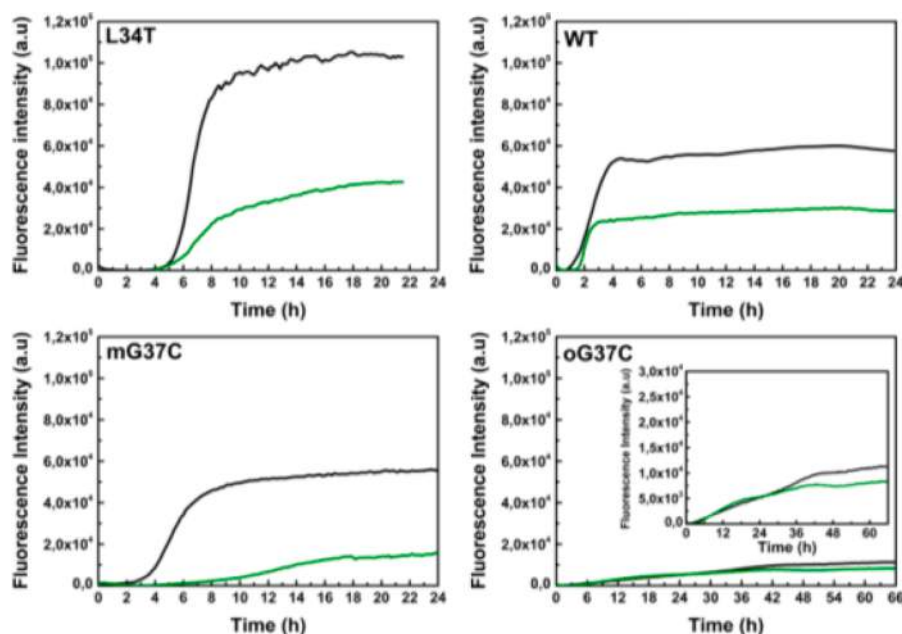
**Table 1.** Variation of Resonance Minimum Position for Both *s*- and *p*-Polarization after Addition of Peptides to DOPG Bilayer<sup>a</sup>

	L34T		WT		mG37C		oG37C	
	s	p	s	p	s	p	s	p
total shift (mdeg)	26 ± 0.71	25 ± 9.89	26 ± 1.41	32 ± 5.66	27 ± 1.41	25 ± 2.83	81 ± 7.07	74 ± 0.71
thickness (nm)	1.5		1.5–2.5		1.5		4.5–5	

<sup>a</sup>Increase in membrane thickness due to peptide injection.

**Table 2.** Accumulation Rate Constants of the  $A\beta_{1-42}$  (WT) and Variants on DOPG Bilayer Obtained by Fitting the PWR Kinetic Curves with One-Phase ( $k_1$ ) or Two-Phase ( $k_1$  and  $k_2$ ) Exponential Equations

	accumulation rate constant ( $\text{min}^{-1}$ )			
	L34T	WT	mG37C	oG37C
$k_1$	$0.0165 \pm 9 \times 10^{-3}$	$0.0033 \pm 7 \times 10^{-4}$	$0.0040 \pm 8 \times 10^{-4}$	$0.015 \pm 5 \times 10^{-5}$
$k_2$				$0.002 \pm 6 \times 10^{-4}$



**Figure 4.** ThT fluorescence intensity to monitor the fibril formation of WT, L34T, mG37C, and oG37C without lipids (black curve) and in the presence of DOPG LUVs (green curve). The peptides ( $20 \mu\text{M}$ ) were incubated with  $400 \mu\text{M}$  of DOPG LUVs (Ri20). Three independent measures have been done; the variation was less than  $\pm 3\%$ .

the oG37C on the membrane. The second phase, that appears to be specific of the oligomeric form, may be due to the reorganization of the lipid following its binding. Such lipid reorganization involves perturbation in membrane integrity, as already proven by large calcein leakage observed for DOPG LUVs, described above.

With a zwitterionic membrane (DOPC), a positive shift for both polarizations was observed but rinsing the cell with buffer after 20h incubation, removed peptide from the bilayer (see Supporting Information, Figure 1S). This is characteristic of nonspecific binding, the residual signal (positive shift relative to the membrane after washing of the peptides) being considered negligible. Then, there is poor affinity of the peptides for PC membrane. These results are also in agreement with calcein leakage measurements where no leakage of DOPC LUVs was observed upon peptide addition. Altogether, these results demonstrate that monomeric  $A\beta$  interacts specifically with DOPG membranes and indicate that oligomeric isoform (oG37C) provokes more efficiently their reorganization and concomitant leakage. Interestingly, the more toxic mutant (G37C) induces the highest leakage, but binds the membrane with similar rate constants.

In the past few years we developed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, a model of amyloid toxicity based on toxic mutants of the HET-s prion of *Podospora anserina*.<sup>34,35</sup> We observed that the WT peptide only binds to the membrane, organizing itself in the form of isolated fibers with no aggregation or membrane disruption. We established that toxic mutant (M8) binding to anionic lipids promotes its aggregation and formation of

microdomains (“amyloid rafts”) accompanied by significant membrane leakage.<sup>33,36</sup> Similar PWR spectral shifts have been observed for oG37C when compared with the toxic M8 mutant interacting with DOPG lipids.<sup>23</sup> Similar rate constant for PG interaction, similar increase in membrane thickness upon peptide accumulation were determined.<sup>23</sup> Comparing both amyloids, it seems that oligomeric toxic mutant (M8 or oG37C) strongly interacts with DOPG inducing a large rearrangement in membrane. Interaction between peptides and lipids also has a huge consequence on the fibrillization process of the peptide, as referred above.

**Interaction with DOPG Membrane Modifies Peptide Fibrillization.** The process of fibrillization can be modulated by different factors, in particular by the presence of lipids, specially their headgroups and charge. Thioflavin T (ThT) was used to detect amyloid fiber formation with or without DOPG (Figure 4). Without lipids, L34T, WT, and mG37C show the typical S-shaped curves characteristic of amyloid fibril formation (Figure 4, curve a).<sup>37</sup> After a lag phase (corresponding to the formation of the nucleus) an exponential increase is observed until a plateau is reached. According to our previous work, oG37C is not able to form long fibers, a very small increase of the fluorescence was observed.<sup>5</sup>

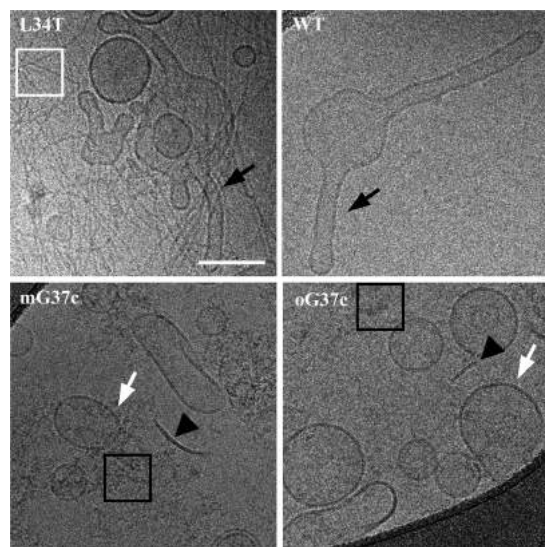
When incubated with DOPG, ThT fluorescence of all peptides significantly decreases (Figure 4, curve b). The lag phase was similar for WT and L34T in the presence of lipid, but the amount of formed fibers is smaller, according to the decrease of the ThT fluorescence. In the literature, in the case of  $\alpha$ -synuclein,<sup>38</sup> IAPP,<sup>39</sup> or  $A\beta_{1-40}$  peptide,<sup>40</sup> negatively



charged lipids accelerate fiber growth in a membrane environment compared to solution. In contrast, neutral lipids in liposomes may slow down  $A\beta$  self-assembly process.<sup>41</sup> In our study, the driving force for the interaction with the membrane is different with the  $A\beta_{1-42}$  (and the variants), and that could explain their distinct behavior. Amyloid fibrillization propensity is dramatically decreased with mG37C. The slope of ThT binding kinetics decreases and the value of the plateau is reached 10 h later when comparing with the same experiment in absence of lipids. The ThT fluorescence values are similar for both G37C peptide forms. The mG37C in the presence of DOPG seems to form only small oligomers that could behave as the oG37C. This is in agreement with the results obtained from calcein leakage (see above) with similar levels of the calcein leakage being observed for mG37C or oG37C (see Figure 1). Then, the PG membrane inhibits the formation of long fibers. Sciacca et al.<sup>19</sup> demonstrate that membrane disruption  $A\beta_{1-40}$  occurs by two step mechanism with the initial formation of ion-selective pores followed by non specific fragmentation of the lipid membrane during amyloid formation. By PWR we have also established that the interaction between oG37C and PG membrane follows a two step mechanisms. However, our ThT data demonstrate that PG inhibits the fibrillization process. Thus, membrane fragmentation cannot be due to fiber elongation. We propose that, the first step could correspond to the anchorage of the oG37C on the membrane and second one, to the reorganization of the lipid following its binding ultimately leading to its disruption. Cryo-TEM was used to visualize the effect of the peptides on liposome integrity and is present below.

#### $A\beta$ Variants Perturb Differently DOPG Liposomes.

Cryo-TEM was used to follow morphological changes of DOPG liposomes upon incubation with the four peptides. WT and L34T (after 2 h of incubation) induce a tubular shape in liposomes suggesting that they could modify the membrane curvature (Figure 5 and Supporting Information, Figure 2S).



**Figure 5.** CryoTEM images of DOPG LUVs incubated during 2 h with the different peptides at a peptide lipid ratio of 40  $\mu$ M/20  $\mu$ M in Tris buffer at pH 7.4. White and black squares indicate fibers and aggregates, respectively. White and black arrows indicate liposomes with tubular shape and opened liposomes, respectively, whereas arrowhead indicates membrane fragments. Scale bar is 100 nm.

The modification of the curvature is not dependent on the fiber growth, as it was demonstrated for the effect of the hIAPP peptide on liposomes.<sup>42</sup> There is no common mechanism of interaction with membrane for both  $A\beta$  and hIAPP. In addition fibers composed of L34T peptide are clearly visible whereas for WT, fibers were scarcely encountered probably due to its lower concentration. Interestingly, fibers form a muddled organization overlaying liposomes either deformed or not. No fiber anchorage on the liposome surface is observed suggesting that fibrillization of soluble  $A\beta_{1-42}$  peptides occurs at the same time, and independently of the presence of the liposomes. The fibers formed do not modify liposome structure which is in accordance with the fact that fibers alone are not responsible for leakage. For mG37C and oG37C, the images reveal large assembly of oligomers (called aggregates), membrane fragments and opened liposomes suggesting that both forms disrupt lipid membranes. No deformed liposomes or tubules were observed. The effect of oG37C and mG7C are similar; they disrupt the membrane and aggregates are observed. For mG37C, no long fibers were observed in the presence of lipids, in contrast with solution. The presence of lipid clearly prevents fibrillization, in agreement with ThT results. The results emphasize the fact that the membrane can induce a different fibrillization process. mG37C in contact with DOPG membrane behaves as the oG37C. These results suggest that membrane can promote the formation of “off pathway” oligomeric species, as oG37C, responsible for its disruption.

Cryo-TEM images after 24 h incubation, show that L34T exhibits a homogeneous repartition of fibers, while WT and mG37C form fibers and aggregates (see Supporting Information, Figure 3S). In L34T sample, almost no aggregates were observed. WT forms more fibers than aggregates and mG37C adopts the reverse behavior, forming more aggregates than fibers. These observations are in total accordance with ThT fluorescence. Also, even if some liposomes are elongated, most of them are intact, confirming the nontoxicity of the bigger assemblies such as fibers or aggregates (small assembly of oligomers). The mG37C adopts the behavior of the oG37C, leading to conclude that the presence of the membrane induce oligomeric species formation that bind and interact specially with the membrane, as already observed after 2 h incubation. Cryo-TEM images revealed some open liposomes for the three peptides but very few compared to the observations made at 2 h incubation for G37C mutants. Some fibers seem to be anchored to vesicles without affecting their morphology. Similar observations have been reported for other amyloid peptides (Het-s) interacting with liposomes.<sup>33</sup> On the other hand, the vesicles present different morphologies when incubated for 24 h with oG37C. The membranes are highly distorted and adopt a tubular shape. The sample is composed of residual intact liposomes, which are around five times bigger than regular ones, opened vesicles, tubules, and pieces of bilayer. No fibers have been observed but small aggregates cover large areas. The large amount of observed aggregates is in agreement with the decrease of the ThT fluorescence observed, less fibrillization occurs in contact with DOPG membranes.

## CONCLUSION

In this study we investigated the interaction of the  $A\beta_{1-42}$  variant (L34T and G37C as monomer and oligomer), with simple membrane models (pure DOPG or pure DOPC). First, our data demonstrates that the driving force for the interaction between all the peptides and membrane is not governed by

electrostatic interaction. The net charge of A $\beta$  is  $-2.8$  at pH 7.4 and poor binding was observed with PC headgroup. The interaction is favored in the presence of PG headgroups that may interact with peptide via hydrogen bonding. All the peptides induce calcein leakage of DOPG LUVs, but their effect on liposome morphology and integrity are different. The kinetics of the interactions, determined by PWR, are quite slow and similar for both peptides used. However, the highest membrane perturbation was in all experiments obtained with the oG37C. Two phases in the interaction were proposed, first corresponding to the anchorage of the oligomer on the membrane and the second involving a reorganization of the membrane that can lead to its disruption, as observed on Cryo-TEM images.

Second, our data reveal that the presence of PG lipids modifies the fibrillization process of amyloid peptides. The mG37C forms long fibers organized in parallel  $\beta$ -sheet in solution whereas it forms aggregates and very few fibers in the presence of DOPG liposomes. mG37C behaves in a similar manner as oG37C in the presence of PG membranes. The membrane seems to promote A $\beta$  oligomerization, highly promoting strong membrane interaction and disruption. Thus, a direct correlation can be established between the toxicity of A $\beta$  variants and their propensity to disrupt membrane. In this process small aggregates (small assembly of oligomers) are formed rather fibers. The toxic oligomers are formed independently of the fibrillization process, which is called off pathway, and their formation can be induced by the presence of OH groups on the membrane surface. Results reinforce the idea that membrane disruption by A $\beta$  peptides does not arise from fiber formation, as it was proposed for hIAPP peptides and that the oligomeric species are the more membrane interacting forms, ultimately inducing its disruption.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### ● Supporting Information

PWR data with DOPC and Cryo-TEM images. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Tel.: +33 540006849. E-mail: [s.lecomte@cbmn.u-bordeaux.fr](mailto:s.lecomte@cbmn.u-bordeaux.fr).

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. We thank Nicolas Arraud and Céline Gounou from the CBMN, UMR 5248 (University of Bordeaux), for their help during phosphate dosage.

## ■ REFERENCES

- (1) Haass, C.; Selkoe, D. J. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 101.
- (2) Kaye, R.; Head, E.; Thompson, J. L.; McIntire, T. M.; Milton, S. C.; Cotman, C. W.; Glabe, C. *Science* **2003**, *300*, 486.
- (3) Stroud, J. C.; Liu, C.; Teng, P.; Eisenberg, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109*, 7717.
- (4) Sarroukh, R.; Goormaghtigh, E.; Ruyschaert, J.-M.; Raussens, V. *Biochem. Biophys. Acta, Biomembr.* **2013**, *1828*, 2328.
- (5) Vignaud, H.; Bobo, C.; Lascu, I.; Margareta Sorgjerd, K.; Zako, T.; Maeda, M.; Salin, B.; Lecomte, S.; Cullin, C. *PLoS One* **2013**, *8*, e80262.

- (6) Liu, C.; Zhao, M.; Jiang, L.; Cheng, P.-N.; Park, J.; Sawaya, M. R.; Pensalfini, A.; Gou, D.; Berk, A. J.; Glabe, C. G.; Nowick, J.; Eisenberg, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109*, 20913.
- (7) *Nat. Neurosci.* **2011**, *14*, 399.
- (8) Walsh, D. M.; Thulin, E.; Minogue, A. M.; Gustavsson, N.; Pang, E.; Teplow, D. B.; Linse, S. *FEBS J.* **2009**, *276*, 1266.
- (9) Berthelot, K.; Cullin, C.; Lecomte, S. *Biochimie* **2013**, *95*, 12.
- (10) Cerf, E.; Sarroukh, R.; Tamamizu-Kato, S.; Breydo, L.; Derclaye, S.; Dufrene, Y. F.; Narayanaswami, V.; Goormaghtigh, E.; Ruyschaert, J.-M.; Raussens, V. *Biochem. J.* **2009**, *421*, 415.
- (11) Qiang, W.; Yau, W.-M.; Luo, Y.; Mattson, M. P.; Tycko, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109*, 4443.
- (12) Celej, M. S.; Sarroukh, R.; Goormaghtigh, E.; Fidelio, G. D.; Ruyschaert, J.-M.; Raussens, V. *Biochem. J.* **2012**, *443*, 719.
- (13) Brender, J. R.; Salamekh, S.; Ramamoorthy, A. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 454.
- (14) Sciacca, M. F.; Brender, J. R.; Lee, D. K.; Ramamoorthy, A. *Biochemistry* **2012**, *51*, 7676.
- (15) Williams, T. L.; Serpell, L. C. *FEBS J.* **2011**, *278*, 3905.
- (16) Butterfield, S. M.; Lashuel, H. A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 5628.
- (17) Kotler, S. A.; Walsh, P.; Brender, J. R.; Ramamoorthy, A. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 6692.
- (18) Lashuel, H. A.; Lansbury, P. T. J. *Q. Rev. Biophys.* **2005**, *39*, 167.
- (19) Sciacca, M. F.; Kotler, S. A.; Brender, J. R.; Chen, J.; Lee, D. K.; Ramamoorthy, A. *Biophys. J.* **2012**, *103*, 702.
- (20) D'Angelo, F.; Vignaud, H.; Di Martino, J.; Salin, B.; Devin, A.; Cullin, C.; Marchal, C. *Dis. Model. Mech.* **2013**, *6*, 206.
- (21) Roussier, G.; Fkeischer, S.; Yamamoto, A. *Lipids* **1970**, *5*, 494.
- (22) Salamon, Z.; Macleod, H. A.; Tollin, G. *Biophys. J.* **1997**, *73*, 2791.
- (23) Harté, E.; Maalouli, N.; Shalabney, A.; Texier, E.; Berthelot, K.; Lecomte, S.; Alves, I. D. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 4168.
- (24) Worm J. WINSPELL, version 3.02.; 2009; <http://www2.mpi-mainz.mpg.de/knoll/soft/>.
- (25) Sani, M.-A.; Gehman, J. D.; Separovic, F. *FEBS Lett.* **2011**, *585*, 749.
- (26) McLaurin, J.; Chakrabarty, A. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *245*, 355.
- (27) Hortschansky, P.; Schroeck, H.; Christopheit, T.; Zandomeneghi, G.; Fändrich, M. *Protein Sci.* **2005**, *14*, 1753.
- (28) Ikeda, K.; Matsuzaki, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *370*, 525.
- (29) Ikeda, K.; Yamaguchi, T.; Fukunaga, S.; Hoshino, M.; Matsuzaki, K. *Biochemistry* **2011**, *50*, 6433.
- (30) Hosshino, T.; Mahmood, M. I.; Mori, K.; Matsuzaki, K. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 8085.
- (31) Salamon, Z.; Tollin, G. J. *Bioenerg. Biomembr.* **1997**, *29*, 211.
- (32) Alves, I. D.; Cowell, S.; Salamon, Z.; Devanathan, S.; Tollin, G.; Hruby, V. J. *Mol. Pharmacol.* **2004**, *65*, 1248.
- (33) Ta, H. P.; Berthelot, K.; Couly-Salin, B.; Castano, S.; Desbat, B.; Bonnafous, P.; Lambert, O.; Alves, I.; Cullin, C.; Lecomte, S. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2012**, *1818*, 2325.
- (34) Couthouis, J.; Rébora, K.; Immel, F.; Berthelot, K.; Castroviejo, M.; Cullin, C. *PLoS One* **2009**, *4*, e4539.
- (35) Berthelot, K.; Immel, F.; Géan, J.; Lecomte, S.; Oda, R.; Kauffmann, B.; Cullin, C. *FASEB J.* **2009**, *23*, 2254.
- (36) Couthouis, J.; Marchal, C.; D'Angelo, F.; Berthelot, K.; Cullin, C. *Prion* **2010**, *4:4*, 283.
- (37) LeVine, H., III *Methods Enzymol.* **1999**, *309*, 274.
- (38) Necula, M.; Chirita, C. N.; Kuret, J. J. *Biol. Chem.* **2003**, *278*, 46674.
- (39) Knight, J. D.; Miranker, A. D. *J. Mol. Biol.* **2004**, *341*, 1175.
- (40) Choo-Smith, L. P.; Garzon-Rodriguez, W.; Glabe, C. G.; Surewicz, W. K. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 22987.
- (41) Sabaté, R.; Gallardo, M.; Estelrich, J. *Colloids Surf., A* **2005**, *270–271*, 13.
- (42) Engel, M. F.; Khemtémourian, L.; Kleijer, C. C.; Meeldijk, H. J.; Jacobs, J.; Verkleij, A. J.; de Kruijff, B.; Killian, J. A.; Höppener, J. W. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 6033.